

บทที่ 1

บทนำ

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติซึ่งมนุษย์ใช้ประโยชน์ต่อกันมานาน ทั้งในด้านอาหาร ยา รักษาโรค เครื่องสำอาง และอื่น ๆ ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา กระแสการดูแลสุขภาพโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ กำลังกลับมาได้รับความนิยมอีกครั้ง ทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และประเทศไทย ในปี 2541 พบว่ายอดขายผลิตภัณฑ์สมุนไพรในสหรัฐนั้น สูงถึงประมาณหนึ่งพันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ โดยที่ขยายตัวจากปีก่อนหน้านั้นถึงร้อยละ 54 ตลาดสมุนไพรขนาดมหึมาเหล่านี้ เป็นโอกาสอันดีของประเทศไทยในการพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ระดับอุตสาหกรรมเพื่อการใช้ในประเทศและการส่งออก ผู้ผลิตจะต้องพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้ได้มาตรฐาน กระบวนการเหล่านี้รวมถึงการเลือกวัตถุดิบ กระบวนการผลิตที่ดี และวิธีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ที่ดี

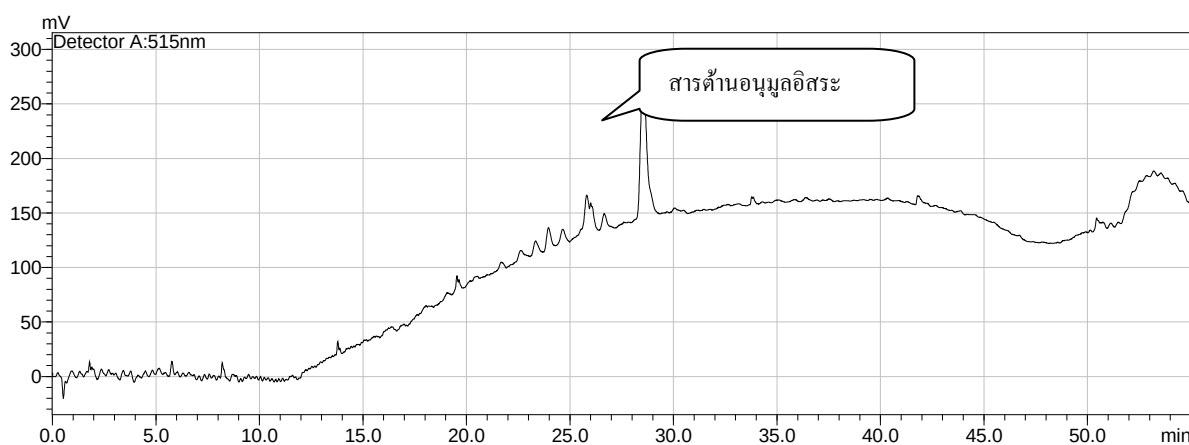
กฤษณา เป็นไม้สกุล *Aquilaria* วงศ์ *Thymelaeaceae* เป็นพืชที่พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นที่รู้จักกันในแง่ที่เนื้อไม้ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีมูลค่าสูง มีกลิ่นหอมทนนาน และใช้ประโยชน์ได้ในทางยาและเครื่องสำอางมากมาย ในทางตรงกันข้ามการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับใบกฤษณาน้อยมาก จากการทดลองเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของใบกฤษณามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ลดการสร้างฮอร์โมนเพศชายอย่างอ่อนๆ มีแนวโน้มว่าจะทำให้หลอดเลือดหดตัว และ ด้านการอักเสบ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไขมัน จากการทดสอบฤทธิ์ของกฤษณาต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดใบกฤษณาไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ และสารสกัดไม่มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังและเซลล์ macrophage ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกฤษณามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ควรที่จะนำมาศึกษาในระดับลึกต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและครบถ้วนขึ้น

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดจากต้นกฤษณา (*Aquilaria malaccensis* Benth.) พบว่ามีฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลาง ซึ่งเมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดขนาด 1,000 มก./กก. จะเกิดอาการซึม เคลื่อนไหวน้อยลง ลดอาการเจ็บปวด เสริมฤทธิ์ยาสลบบาร์บิทูเรต และทำให้อุณหภูมิกายลดลง (Okugawa et al., 1993) ซึ่งอาจเกิดจากฤทธิ์ของสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิดในกฤษณา คือ jinkoh-eremol และ agarospiol ที่กระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโตนินในสมอง ทำให้รู้สึกผ่อนคลาย (Okugawa et al., 1996) ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้อธิบายถึงผลการประยุกต์น้ำมันหอมระเหยในด้านกลิ่นบำบัดเพื่อสุขภาพ หรือ aromatherapy ถึงแม้ว่าผลการวิจัยในมนุษย์จะพบว่าน้ำมันกฤษณาไม่ได้ช่วยให้นอนหลับง่ายขึ้น และไม่มีผลต่อพฤติกรรมนอน ระยะเวลา รวมทั้งรูปแบบการนอนหลับในคนปกติแต่อย่างใด (Tanaka et al., 2002) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองเมื่อเร็วๆ นี้ พบว่าเมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยของต้นกฤษณาโดยการสูดดมในกล่องศึกษาพฤติกรรมประมาณ 30-60 นาที หนูทดลองมี

การเคลื่อนไหวที่ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีผลมากกว่าน้ำมันหอม lavender หรือสารหอมระเหยที่เป็นตัวทำลายเพียงอย่างเดียว (Takemoto et al., 2008)

สำหรับรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากส่วนใบของต้นกฤษณา ยังมีค่อนข้างน้อยเช่นกัน โดยผลงานวิจัยของ Zhou และคณะ ได้รายงานว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) มีฤทธิ์ด้านความเจ็บปวดและลดการอักเสบในหนูทดลอง (Zhou et al., 2008) นอกจากนี้ Hara และคณะ (2008) ได้ระบุว่าเมื่อหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบด้วยอะซิโตนของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) ทางปากด้วยขนาด 1,000 มก./กก. สามารถกระตุ้นระบบขับถ่ายดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (โดยไม่ทำให้ท้องเสีย) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงความเป็นพิษเมื่อได้รับสารสกัดในปริมาณที่มากแบบครั้งเดียวและเมื่อได้รับสารสกัด 3 ขนาดแบบเรื้อรังนาน 6 เดือน ซึ่งข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญต่อการนำไปสู่การวิจัยในเชิงลึกและการพัฒนาสารสกัดจากใบกฤษณานี้ให้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาวิธีการสกัด และการควบคุมคุณภาพ จากที่ผู้วิจัยได้ทำ preliminary study โดยวิเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระโดยต่อวิธีวิเคราะห์ DPPH assay เข้ากับ HPLC-MS (LC/MS/MS online coupling with DPPH assay) เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารออกฤทธิ์ ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 1 พบ peak ที่น่าสนใจของสารต้านอนุมูลอิสระ และมีแนวโน้มที่จะบ่งชี้เอกลักษณ์ และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (marker) ได้ เมื่อได้ควบคุมคุณภาพสารสกัดแล้ว ผู้วิจัยจะนำสารสกัดที่ได้มาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังในสัตว์ทดลอง ข้อมูลที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการนำไปสู่การวิจัยในมนุษย์ และการพัฒนาสารสกัดจากใบกฤษณานี้ให้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ



รูปที่ 1. chromatogram จาก LC/MS/MS online coupling with DPPH assay เมื่อวิเคราะห์สารสกัด ethanol ของใบกฤษณา

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเตรียมสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*) พัฒนาวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*) สำหรับใช้ในการทดลองของโครงการ
2. เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*) เมื่อได้รับสารสกัดอย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ เป็นการวิจัยทางเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยศึกษาการเตรียม และการควบคุมคุณภาพ ของสารสกัดใบกฤษณา โดยจะใช้วิธี LC/MS/MS online coupling with DPPH assay วิเคราะห์และบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในกฤษณา และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (marker) รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณา

ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

กฤษณา เป็นที่รู้จักกันในแง่ที่เนื้อไม้ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีมูลค่าสูง มีกลิ่นหอมทนนาน และใช้ประโยชน์ได้ในทางยาและเครื่องสำอางมากมาย อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับใบกฤษณาน้อยมาก จากการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้พบว่า สารสกัดจากใบกฤษณา มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้านการอักเสบ และทำให้หลอดเลือดหดตัว จึงเห็นว่าควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรกฤษณาอย่างคุ้มค่า

โครงการวิจัยนี้ เป็นการวิจัยทางเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยศึกษาการเตรียม และการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบกฤษณา โดยจะใช้วิธี LC/MS/MS online coupling with DPPH assay วิเคราะห์และบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบกฤษณา และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (marker) ตลอดจนศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการเตรียมสารสกัดใบกฤษณาที่มีคุณภาพ
2. รู้องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในใบกฤษณา และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (marker)
3. ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบกฤษณา เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณา
4. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความเสี่ยงต่อความเป็นพิษเมื่อได้รับสารสกัดในปริมาณที่สูง

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

มหาวิทยาลัยนเรศวร และผู้ผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จะรับการถ่ายทอดเทคโนโลยี

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

กฤษณา หรือไม้หอม เป็นไม้สกุล *Aquilaria* วงศ์ Thymelaeaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 18-30 เมตร ลำต้นตั้งตรง เรือนยอด เป็นพุ่มทรงเจดีย์ต่ำๆ เปลือกลำต้นเรียบสีเทา เนื้อไม้อ่อนสีขาวมีกลิ่น น้ำหนักเบา จะมีราคาเมื่อเนื้อไม้มีน้ำมันกฤษณา ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยราคาแพง เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ

เอกสารเผยแพร่การปลูกไม้เศรษฐกิจ ของกรมป่าไม้ กล่าวว่าไม้สกุล *Aquilaria* มีอยู่ประมาณ 15 ชนิด กระจายอยู่แถบเอเชียเขตร้อน ในประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงฟิลิปปินส์ และเอเชียใต้แถบประเทศอินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา ภูฏาน เบนกอล รัฐอัสสัม รวมทั้งกระจายไปทางเอเชียเหนือจนถึงประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนการกระจายพันธุ์ของไม้กฤษณาในประเทศไทย มีรายละเอียดดังนี้

1. *A. crassna* Pierre ex Lecomte พบในป่าดิบชื้นและป่าดิบแล้งทางภาคเหนือ (เชียงราย แพร่ น่าน) ภาคกลาง (กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ โดยเฉพาะพบมากที่สุดที่บ้านห้วยตะหวัก อำเภอน้ำหนาว บริเวณเขาถือ) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ นครนายก ปราจีนบุรี กบินทร์บุรี โดยเฉพาะพบมากที่สุดที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ บริเวณคงพญาไฟ)

2. *A. malaccensis* Lam. (ชื่อพฤกษศาสตร์พ้อง *A. agallocha* Roxb.) พบเฉพาะภาคใต้ที่มีความชุ่มชื้น (เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง กระบี่ ตรัง พัทลุง ยะลา โดยเฉพาะที่เขาช่อง จังหวัดตรัง) มีบางรายงานกล่าวว่ากฤษณาพันธุ์นี้ ให้น้ำมันที่มีคุณภาพและปริมาณปานกลาง

3. *A. subintegra* Ding Hau พบเฉพาะทางภาคตะวันออก (ระยอง จันทบุรี ตราด โดยเฉพาะที่เขาสอยดาว) ให้น้ำมันปริมาณสูงที่สุด

คนไทยได้ใช้ประโยชน์จากกฤษณาในทางยา มานานแล้ว ดังปรากฏ ในตำรายาพระโอสถสมัย สมเด็จพระนารายณ์มหาราช พ.ศ.2202 กล่าวถึงตำรายาที่เข้ากฤษณาหลายชนิด ในตำรายาไทยระบุว่า กฤษณารสขมหอม สุขุม กุมธาตุ บำรุงโลหิตในหัวใจ (อาการหน้าเขียว) บำรุงหัวใจ บำรุงตับปอดให้เป็นปกติ แก้ลมวิงเวียนศีรษะ หน้ามืด แก้ลมชาง แก้ไข้ อาเจียน ท้องร่วง บำบัดโรคปวดตามข้อ ตำรับยาที่เข้ากฤษณามีหลายชนิด เช่น ตำรายาเด็กในคัมภีร์ปฐุมจินดา กล่าวว่ากฤษณาจะเข้ายาแก้ชาง แก้ไข้ แก้พิษ เช่น ยาแดง ยากายพิษ ยาทาลิ้น ทาแก้เสมหะ ยาแก้ไข และยาล้อมตับดับพิษ ยากวาดแก้คุณนมมิได้ ยาหอมใหญ่ แก้ชาง แก้ไข้ ยาเทพมงคล ยาสมมติ कुमारน้อย ยาสมมติ कुमारใหญ่ ยาอินทบรรจบ ยาแก้ชางเพลิง ยาแก้ท้องเสีย แก้บิดในเด็ก เป็นต้น ส่วนในพระคัมภีร์มหาโชติรัตน์ว่าด้วยโรคระดูสตรี กฤษณา จะเข้ายาบำรุงโลหิต แก้โลหิตเป็นพิษ

เช่น ขาดุมโอสถน้อย-ใหญ่ ยาเทพรังสิต ยาเทพนิมิต กฤษณาจะเข้ายาบำรุงโลหิต บำรุงธาตุ บำรุงกาม เพื่อให้งดงครรภ์ เช่น ยากาลังราชสีห์ ในคัมภีร์ธาตุบรรจบ กฤษณาจะเข้ายาเทพประสิทธิ์ ใช้แก้ลม แก้สลับ แก้ชัก ปัจจุบันตำรับยาที่เข้ากฤษณาก็ยังมีอยู่ เช่น ยากฤษณากลับ แก้ปวดท้อง จุกเสียด แน่น หรือยาหอมที่เข้ากฤษณาก็มีอยู่หลายขนาน มีสรรพคุณ คือ ใช้แก้ลม วิงเวียนจุกเสียด หน้ามืดตาลาย คลื่นเหียน อ่อนเพลีย บำรุงหัวใจ ขับลมในกระเพาะลำไส้ บำบัดโรคปวดท้อง ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ เป็นต้น

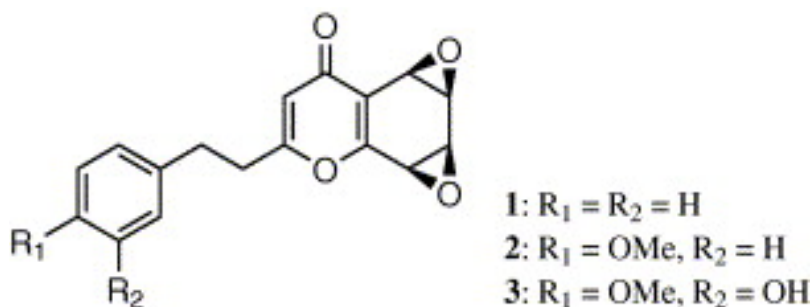
ในตำราจีน กฤษณาจัดเป็นยาชั้นดี มีรสเผ็ดปนขม ฤทธิ์อ่อน ใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ลมวิงเวียน คลื่นไส้อาเจียน รักษาอาการปวดแน่นหน้าอก แก้หอบหืด เสริมสมรรถภาพทางเพศ แก้โรคปวดบวมตามข้อ ขับลมในกระเพาะอาหาร

นอกจากนี้ ยังมีการใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ของกฤษณา เช่น ใช้เผาให้เกิดกลิ่นหอม สูดดมแล้วเกิดกำลังวังชา และถือเป็นมงคล นำมากลั่นเป็นหัวน้ำหอม ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำหอมและเครื่องสำอาง นอกจากนั้นกาก ที่เหลือก็นำไปทำธูปหอมหรือยาหอม ประโยชน์อย่างอื่นของกฤษณา คือ นำไปทำลูกประคำ และหีบใส่เครื่องเพชร เนื้อไม้ปกติจะใช้ทำเครื่องกลึง แกะสลัก คันธนู หน้าไม้ เรือเปลือกให้เส้นใยใช้ทำเสื้อผ้า ถุง ยาม ที่นอน เชือก และกระดาษ

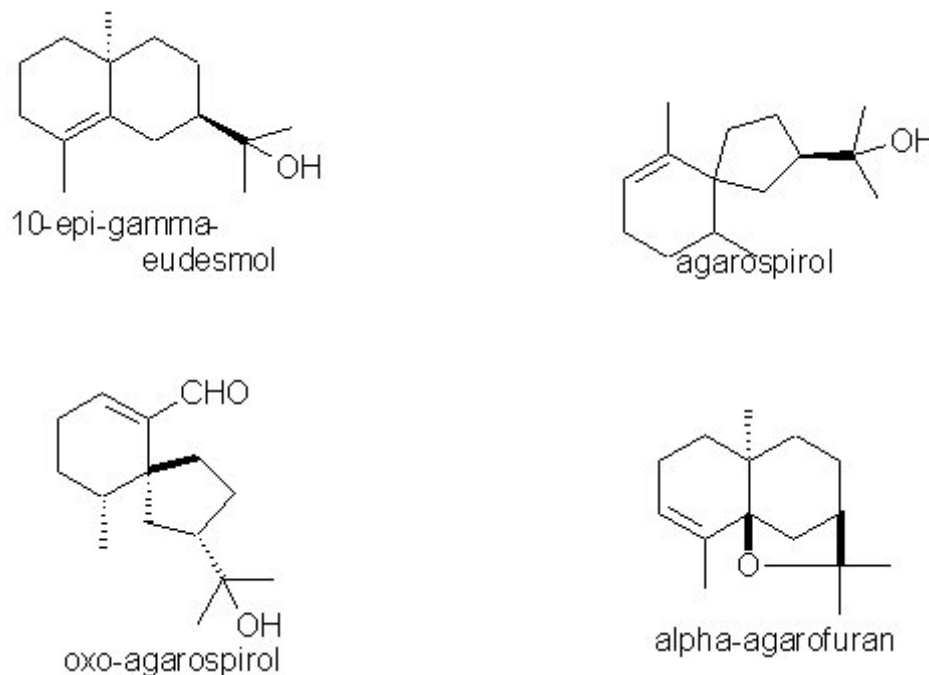
การตรวจคุณภาพของไม้กฤษณา ถ้าทิ้งท่อนกฤษณาลงในน้ำ ท่อนที่จมน้ำมีคุณภาพดีเลิศ เนื้อไม้จะเป็นสีดำมีกลิ่นหอม นิยมใช้ทางยา ถ้าท่อนใดลอยปริ่มน้ำมีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำเงินเข้ม จะเป็นกฤษณาชนิดกลาง สำหรับท่อนที่ลอยน้ำเป็นกฤษณาชนิดเลว พบอยู่ทั่วไป เมื่อเผาเนื้อไม้เกือบไม่มีกลิ่นหอม

มีการวิจัยเรื่องการใช้ประโยชน์ของน้ำมันกฤษณากันมากมาย เช่น พบว่า *A. sinensis* (Lour.) Gilg. และ *A. agallocha* Roxb. มีฤทธิ์ ทำให้ชา (anesthesia) และแก้ปวด (analgesic) โดยที่พืชทั้งสองมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกัน นอกจากนั้น ยังมีการศึกษา พบว่าสารสกัดน้ำจากลำต้นของ *A. agallocha* มีฤทธิ์แก้แพ้ โดยลดการปลดปล่อย histamine จาก mast cells สาร linalool ที่พบใน *A. agallocha* มีฤทธิ์ต้านอักเสบและแก้ปวด

องค์ประกอบทางเคมีที่เคยมีรายงานในกฤษณาได้แก่ chromones และสารกลุ่ม sesquiterpenes



รูปที่ 2. สาร chromones ที่พบในส่วนเนื้อไม้ที่เหนียวทำให้มีน้ำมันหอมระเหยของ *A. crisna*



รูปที่ 3. สารกลุ่ม sesquiterpenes ที่มีรายงานในน้ำมันหอมระเหยจากกฤษณา

เนื่องจากน้ำมันกฤษณามีราคาสูง ปัจจุบันเกษตรกรจำนวนมากปลูกกฤษณา เพื่อการผลิตน้ำมันหอมระเหย อย่างไรก็ตาม และต้องปลูกพืชเป็นระยะเวลานานหลาย ปี จึงจะได้ผลผลิต และต้องตัดแก่นไม้เพื่อที่จะกลั่นเป็นน้ำมัน จึงเป็นที่น่าจะสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของใบกฤษณา เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า

จากการสืบค้นวรรณกรรม ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาสารสกัดจากใบกฤษณามากนัก Zhou และคณะ (2008) รายงานว่า มีการใช้ใบกฤษณาในมณฑลกว่างตุงของจีน และได้หวั่น ในการเป็นยาภายนอกรักษารอยฟกช้ำ และจากการทดลองพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จาก *A. sinensis* มีฤทธิ์แก้ปวดและต้านอักเสบ แต่สารออกฤทธิ์นั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสกัดใบกฤษณาด้วยน้ำ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญกลุ่ม total phenol และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกฤษณาโดยใช้ DPPH assay และ ใช้เทคนิคทาง LC/MS/MS online coupling with DPPH assay ที่เคยพัฒนาขึ้นมาก่อน ในการพิสูจน์เอกลักษณ์หาสารต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไม้กฤษณาส่วนใหญ่จะเป็นในด้านการเกษตร ที่เน้นถึงกระบวนการเพาะปลูก และการเร่งผลผลิต (ดีพร้อม, พ.ศ.2537; องอาจ, พ.ศ. 2546) สำหรับงานวิจัยทางเภสัชวิทยายังมีค่อนข้างน้อย

โดยมีรายงานวิจัยว่าเมื่อหนุททดลองได้รับสารสกัดจากต้นกฤษณาพันธุ์ *Aquilaria malaccensis*) ขนาด 1,000 มก./กก. แล้วเกิดอาการซึม มีพฤติกรรมเคลื่อนไหวน้อยลง ลดการเจ็บปวดจากการทดสอบด้วยแผ่นร้อนและการฉีดกรดอะซิติกเข้าช่องท้อง เสริมฤทธิ์ยาสลบบาร์บิทูเรต และทำให้อุณหภูมิกายลดลง (Okugawa et al., 1993) ซึ่งเมื่อทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวซ้ำอีกโดยใช้สารสกัดบริสุทธิ์จากต้นกฤษณา คือ jinkoh-eremol และ agarospiol ก็ได้ผลที่สอดคล้องและคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากหนุททดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบ และยังพบอีกด้วยว่าหลังจากให้สาร jinkoh-eremol และ agarospiol ในขนาด 200 มก/กก และ 50 มก/กกตามลำดับ ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับของสารสื่อประสาทกลุ่ม monoamines แต่ระดับของ homovalilic acid (HVA) ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ของสารสื่อประสาทซีโรโทนินมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว (Okugawa et al., 1996) ซึ่งผลการวิจัยของ Okugawa และคณะชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของไม้กฤษณาน่าจะมีฤทธิ์กระบบประสาทส่วนกลางมากกว่าฤทธิ์กระตุ้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในหลอดทดลอง (*in vitro* studies) เกี่ยวกับผลของสารสกัดจากต้นกฤษณา โดย Suvitayavat และคณะ (2005) ได้รายงานว่ายาหอมไทยที่มีส่วนผสมของต้นกฤษณา สายพันธุ์ *Aquillaria agallocha* มีฤทธิ์เพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ผนังหลอดเลือดแดงของหนูในหลอดทดลอง และผลงานวิจัยของ Miniyar และคณะ ในปี 2009 ได้ระบุว่าสารสกัดต้นกฤษณา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบในหลอดทดลอง โดยพบว่าเมื่อใช้สารสกัดในขนาด 500-3000 ไมโครกรัม/มล. สามารถยับยั้งผลของ nitrite-induced oxidation ของฮีโมโกลบินของคนได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่มีสารสกัด ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น สอดคล้องกับผลงานวิจัยนำร่องของ กรกนก อิงคินันท์ และคณะ ที่ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และเปรียบเทียบกับ Trolox (ผลงานยังไม่ได้เผยแพร่)

ใบของต้นกฤษณา ยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยเช่นกัน โดยผลงานวิจัยของ Zhou และคณะ ได้รายงานว่สารสกัดแอลกอฮอล์ของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) มีฤทธิ์ด้านความเจ็บปวดและลดการอักเสบในหนุททดลอง (Zhou et al., 2008) นอกจากนี้ Hara และคณะ (2008) ได้ระบุว่าเมื่อหนุททดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบด้วยอะซีโตนของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) ทางปากด้วยขนาด 1,000 มก./กก. สามารถกระตุ้นระบบขับถ่ายดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (โดยไม่ทำให้ท้องเสีย) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงควรสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบกฤษณาเพิ่มมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการศึกษาการเตรียม การควบคุมคุณภาพและความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในสัตว์ทดลองนี้ จะมีการดำเนินการวิจัยต่อเนื่อง 2 ขั้นตอน คือ

- 1.การศึกษาการเตรียมและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบกฤษณา
- 2.การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในสัตว์ทดลอง

การศึกษาการเตรียมและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบกฤษณา

1. การเตรียมสารสกัด ของใบกฤษณา

1.1 การเตรียมสารสกัดน้ำจากใบกฤษณา

- 1.1.1 ตัวอย่างพืชได้รับความอนุเคราะห์จากเจ้าอาวาส วัดพระศรีรัตนมหาธาตุวรมหาวิหาร จังหวัดพิษณุโลก (ปลูกที่จังหวัดพิษณุโลก) โดยระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Aquilaria Subintegra* เก็บเฉพาะใบในส่วนยอดของพืชในช่วงเดือนมิถุนายน 2553-มีนาคม 2554
- 1.1.2 นำใบไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 วัน
- 1.1.3 เมื่ออบพืชแล้วนำไปบด และชั่งน้ำหนักไว้
- 1.1.4 จากนั้นต้มน้ำให้เดือดประมาณ 95-100 °C แล้วเทน้ำให้ท่วมลงในผงพืชที่บดไว้ในอัตราส่วน ผงพืช 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร (สำหรับ freeze dry มีน้ำหนักผงพืช 292 g/น้ำ 3.2 ลิตร และ spray dry เท่ากับ 410 g / น้ำ 4 ลิตร) และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- 1.1.5 จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วเก็บส่วนน้ำพืชเก็บไว้เพื่อทำการทดลอง freeze dry และ spray dry ต่อไป

1.2 การ Freeze dry

- 1.2.1 นำน้ำพืชที่กรองแล้วเทใส่ขวด ประมาณ $\frac{3}{4}$ ของขวด และปิดปากขวดด้วยฟอยล์
- 1.2.2 นำพืชที่เตรียมแล้วไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 20 ประมาณ 1 วัน
- 1.2.3 หลังจากนั้นนำไป freeze dry ด้วยเครื่อง freeze dryer เป็นเวลา 3 วัน
- 1.2.4 เมื่อ freeze dry เรียบร้อยแล้ว นำผงสารสกัดทั้งหมดมาชั่ง และคำนวณหาน้ำหนัก % yield ที่ได้

สภาวะของเครื่อง freeze dry

Volume : condenser volume, L : 10.4

: Total ice capacity, L: 6

Temperature : condenser temperature, °C : -55

Rate : Ice capacity, L/24h : 3

ยี่ห้อ : Thermo Scientific Heto

รุ่น : Lyolab 3000 Freeze dryer 230V 50Hz 6L ice capacity 3 L/day

Pump : Welch® W Series vacuum pump

: vacuum pumping speed $\leq 30,000$ torr

1.3 การ spray dry

1.3.1 นำน้ำพืชที่กรองแล้วเทใส่ขวดหรือบีกเกอร์แล้วนำไป spray dry ด้วยเครื่อง spray dryer

1.3.2 เมื่อ spray dry เรียบร้อยแล้ว นำผงสารสกัดทั้งหมดมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณหา % yield

สภาวะของเครื่อง spray dry

inlet temperature : 175 °C

outlet temperature : 75 °C

ยี่ห้อ : Buchi

รุ่น : mini spray dryer B-290

1.4 การสกัดสารจากตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Ethanol และ hexane)

1.4.1 เตรียมตัวอย่างใบกฤษณา บด และทำให้แห้งตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

1.4.2 เติม Ethanol ลงไปพอท่วมผงพืช

1.4.3 หมักผงพืชไว้ 3 วันจึงนำไปกรองแล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotar evaporator จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียว กากพืชนำไปหมักอีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีเดิม แล้วบันทึกผล

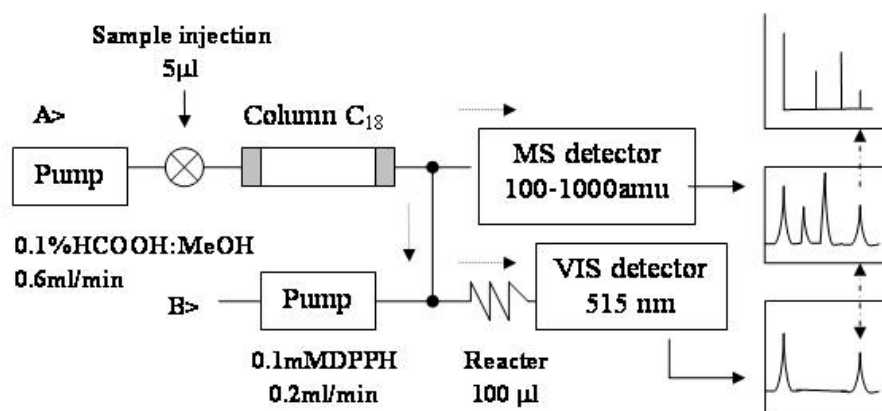
1.4.4 สำหรับสารสกัด hexane ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ hexane แทน ethanol

1.5 การคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักพืชแห้ง}} \times 100$$

2. การบ่งชี้สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยวิธี LC-ESI-MS coupled with DPPH assay

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent 1100 series, USA) ต่อกับเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร (PE SCIEX API 4000 triple quadrupole tandem mass spectrometer, Applied Biosystem, CA) และต่อเข้ากับ DPPH assay ดังรูปที่ 4.



รูปที่ 4. Scheme of the LC-ESI-MS coupled with DPPH assay

สถานะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นดังนี้
สถานะที่ใช้ในการแยกสาร

คอลัมน์	Gemini C18 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm (Phenomenex, USA)
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	A: 0.1% กรดฟอร์มิก
	B: Methanol
ปริมาตรที่ฉีด	5 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	25 °C

สัดส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการแยกสารชนิดต่างๆ

เวลา (นาที)	อัตราการไหล(มล/นาที)	%A (0.1% กรดฟอร์มิก)	%B (Methanol)
0	0.6	90	10
4	0.6	90	10
10	0.6	80	20
40	0.6	10	90
45	0.6	10	90
50	0.6	90	10
55	0.6	90	10

สถานะของส่วนที่เป็น On-line DPPH assay เป็นดังนี้

HPLC prominence (Shimadzu, Japan)

Parameter

Reaction coil PEEK id 180µm	100 µL
Flow rate	200 µL
DPPH concentration	0.1mM
Wavelength	515 nm

ตารางที่ 2 สถานะที่ใช้ของเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร รุ่น API 4000

Tune Parameter	Negative mode	Positive mode
Ionization Type	Electrospray (ESI)	Electrospray(ESI)
Full scan mode		
Atomic mass unit(amu)	100-1000	100-1000
CUR (psi)	10	10
Temperature (°C)	400	400
Ion source gas 1(Air) psi	65	65
Ion source gas 2 (Air) psi	55	55

Ion spray(V)	-4500	4500
Dwell time (sec)	0.5	0.5
Declustering potential(V)	-10 ถึง -80	10-80
MS/MS mode(Product ion scan)		
CAD (psi)	6	7
CE (V)	-5- -50	5-25
CXP (V)	-6	3-13
DP	-20--110	20-100

3. การหาปริมาณ Mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณาโดยวิธี HPLC

3.1 สภาพะของ HPLC

Pump ; Shimadzu LC-20AT Liquid Chromatography

Detector ; Shimadzu SPD-20A UV/VIS

Column ; Phenomenex Germini 5u C18 110A 150x4.60 mm 5 micron

Guard column ; Phenomenex C18

Isocratic system ; ACN/Water (3% acetic acid) 14:86

Autoinjector; 20 ul

Detection ; 257 nm

Flow rate ; 1 ml/min

3.2 การเตรียมสารมาตรฐาน mangiferin

เตรียมสารตัวอย่างมาตรฐาน mangiferin ละลายใน MeOH ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 mg/ml และทำการเจือจางสารโดย MeOH ให้มีความเข้มข้น 150.0, 75.0, 35.5, 18.8, 9.4 และ 4.7 µg/ml เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อที่จะนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และนำค่าที่ได้มา plot graph ใช้เป็น Standard curve เพื่อใช้หาค่าปริมาณ mangiferin

3.3 การเตรียมสารสกัดใบกฤษณา

นำสารสกัดที่ได้จากวิธี Freeze-Dry มาละลายด้วย MeOH เตรียมให้เป็น 0.05 mg/ml เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อที่จะนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC นำค่า peak height มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ที่มีอยู่ในกฤษณา โดยเทียบจาก Standard curve

3.4 การทำ method validation

3.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างมาตรฐาน mangiferin ใน MeOH ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mg/ml และทำการเจือจางสารโดย MeOH ให้มีความเข้มข้นต่างๆ จากความเข้มข้นสูงสุดไปต่ำสุดประมาณ 10 ความเข้มข้น เพื่อที่จะนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC หาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมใช้เป็น Standard curve

3.4.2 Linearity

นำตัวอย่างสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ข้างต้น 10 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เลือกช่วงความเข้มข้นที่ทำให้เกิดกราฟเส้นตรงที่ค่า $r^2 = 0.9990$ ขึ้นไป

3.4.3 Limit of detection (LOD)

เตรียมสารที่ความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร mangiferin เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ให้สัญญาณของตัวอย่างมากกว่าสัญญาณของ noise 3 เท่า

3.4.4 Limit of quantification (LOQ)

หาปริมาณของ mangiferin ต่ำสุด ใน calibration curve

3.4.5 Precision (Intraday and Interday)

เตรียม mangiferin ที่ 3 ความเข้มข้น ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นใน calibration curve เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday) และระหว่างวัน (interday) คำนวณเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ไม่ควรเกิน 15 %

3.4.6 Accuracy

เตรียม mangiferin ที่ 3 ความเข้มข้น เติมลงไปในการสกัดในกฤษณาที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยความเข้มข้นที่ได้ต้องอยู่ในช่วงของ calibration curve เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณ %

accuracy โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ mangiferin ที่วัดได้เทียบกับความเข้มข้นที่เตรียมไว้ คิดเป็น % accuracy ที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 85-115%

4. การวิเคราะห์ total polyphenol

การวิเคราะห์ total polyphenol ทำโดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าที่ได้คำนวณเป็น gallic equivalent รายละเอียดในการทดลองเป็นดังนี้

4.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

- ตัวอย่างได้แก่
- ผงแห้งใบกฤษณา
 - ผงแห้งชาเขียว
 - สารสกัดกฤษณา จากวิธีการ spray-dry
 - สารสกัดกฤษณา จากวิธีการ freeze-dry
 - สารสกัดชาเขียว

ในส่วนของการหาค่า total polyphenol ของผงแห้งพืช (ใบกฤษณา และใบชาเขียว) เตรียมตัวอย่างโดยการทำการสกัดด้วย 70% MeOH ตามรายละเอียดดังนี้ นำเอาผงพืชตัวอย่าง 500 mg มาผ่านแรงเบอร์ 60 มาสกัดกับ 70% MeOH 10 ml แล้วทำการ sonicate 20 นาที แล้วกรอง จากนั้นสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดิม แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml ใน volumetric flask ได้สารละลายความเข้มข้น 20 mg/ml (สารละลายที่ได้เตรียมจากผงพืช 20 mg ใน methanol 1 ml) แล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ (0.1-0.5 mg/ml) เตรียมตัวอย่าง 3 ครั้ง เพื่อทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การเตรียมสารสกัดกฤษณาจากวิธีการ spray-dry และ freeze-dry เป็นไปตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว ส่วนสารสกัดชาเขียวได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. เนติ วรรณุช โดยวิธีการสกัดเป็นไปตามวิธีที่รายงานโดย Wisuttirot และคณะ (2011) กล่าวโดยย่อคือนำผงชาอัสสัม (10 กรัม) มาชงในน้ำร้อน (140 มิลลิลิตร 80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรอง แล้วนำสารละลายที่กรองได้มา partition ด้วย Chloroform เพื่อขจัดสารที่ไม่มีขั้ว จากนั้นนำชั้นน้ำมาสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำสารละลายในชั้น ethyl acetate มาระเหยภายใต้ความดันต่ำ ได้เป็นสารสกัดชาเขียวมาใช้ในการทดลอง

4.2 การทำ calibration curve ของ Gallic acid

เตรียมสาร gallic acid เป็น 10 ความเข้มข้น คือ 0.200, 0.100, 0.070, 0.050, 0.030, 0.010, 0.007, 0.005, 0.003 และ 0.001 mg/ml ละลายใน 70% MeOH ทำการทดสอบหาค่า total polyphenol แล้วนำมา plot graph

4.3 วิธีการวิเคราะห์ Total polyphenol

1. นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติม 2.5 ml Folin Ciocalteu Reagent ที่ถูกเจือจางโดยน้ำ 10 เท่า
3. เติม 2.0 ml Na_2CO_3 (75 g/l in water)
4. นำไป vortex ให้เข้ากัน
5. นำหลอดทดลองแช่ใน water bath 50 °C เป็นเวลา 5 นาที
6. วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm

ผลการทดลองที่แสดงได้เป็นค่า total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัมตัวอย่าง (gGA/kg)

5. การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ DPPH

5.1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน trolox

ทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระ และใช้ trolox เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (positive control) โดยการเตรียมสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีรายละเอียดดังนี้

ละลาย trolox ใน MeOH เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายใน assay (เมื่อเติม DPPH แล้ว) ดังนี้ 0.33, 1.00, 1.67, 2.33, 3.33, 10.00, 16.67, 23.33, 33.33, 333.33 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำสารละลาย trolox มาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.2 วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

-Mangiferin

ละลายสารตัวอย่างใน MeOH เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น ดังนี้ 0.0003, 0.0010, 0.0016, 0.0023, 0.0033, 0.0050, 0.0060, 0.0100, 0.0166, 0.0233, 0.0333, 0.1000, 0.1666, และ 0.2333 mg/ml จากนั้นนำมาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-ผงใบกฤษณา

ในส่วนของการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงใบกฤษณา เตรียมตัวอย่างโดยการทำการสกัดด้วย 70% MeOH คล้ายกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อหา total polyphenol ดังที่กล่าวมาแล้ว ตามรายละเอียดดังนี้ นำใบ

กฤษณาแห้ง 500 mg มาทำการอบซ้ำ 72 ชม. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดความชื้นในตัวอย่าง แล้วบดให้ละเอียด แล้วนำมาผ่านร่อนเบอร์ 60 ซึ่งน้ำหนักผงละเอียดของใบกฤษณาใต้ร่อนบีกเกอร์ 500 mg เติม 70 % MeOH ลงในตัวอย่างประมาณ 10 ml sonicate 20 นาที ร่อนผ่านกระดาษกรอง ด้วย buchner funnel เก็บ filtrate ที่ได้นำกากไป sonicate กับ 70 MeOH 10 ml อีก 20 นาทีแล้วกรอง และ นำ filtrate ทั้ง 2 ครั้งรวมกัน ปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 25 ml ได้สารสกัด alcohol ของใบกฤษณาที่มีความเข้มข้นที่ 20 mg/ml ใช้เป็น stock solution แล้วนำมาเจือจาง เตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายใน assay (เมื่อเติม DPPH แล้ว) ดังนี้ 3.3333, 1.6667, 1.0000, 0.3333, 0.1667, 0.1500, 0.1000, 0.0500, 0.0333, 0.0167, 0.0100, 0.0033 และ 0.0017 $\mu\text{g/ml}$ เตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-สารสกัดชาเขียว

ละลายสารสกัดชาเขียวใน MeOH เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.0003, 0.0010, 0.0017, 0.0033, 0.0100, 0.0166, 0.0333, 0.0333, 0.1000, 0.1667, 0.3333, 1.0000, 1.6667, 2.6667, 3.3333 mg/ml จากนั้นนำมาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-สารสกัดน้ำของใบกฤษณาจากวิธีการ Freeze-dry

ละลายสารสกัดใบกฤษณาในน้ำ เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.0001, 0.0002, 0.0003, 0.0010, 0.0017, 0.0033, 0.0067, 0.0100, 0.0167, 0.0333, 0.1000, 0.1667, และ 0.3333 mg/ml จากนั้นนำมาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-สารสกัดน้ำของใบกฤษณาจากวิธีการ Spray -dry

ละลายสารสกัดใบกฤษณาในน้ำ เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.0001, 0.0002, 0.0003, 0.0010, 0.0017, 0.0033, 0.0067, 0.0100, 0.0167, 0.0333, 0.1000, 0.1667, และ 0.3333 mg/ml จากนั้นนำมาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-สารสกัด Ethanol และ hexane ของใบกฤษณา

ละลายสารสกัด Ethanol และ hexane ใบกฤษณาด้วย methanol เพื่อเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วนำมาเจือจางเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 0.0001, 0.0002,

0.0003, 0.0010, 0.0017, 0.0033, 0.0067, 0.0100, 0.0167, 0.0333, 0.1000, 0.1667, และ 0.3333 mg/ml จากนั้นนำมาทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเตรียมตัวอย่าง 3 ครั้งเพื่อทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. Pipette ตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงใน 96 well plate หลุมละ 75 ไมโครลิตร
2. Pipette สารละลาย 0.2 mM DPPH ใน MeOH 150 ไมโครลิตร
3. ตั้งทิ้งในที่มืด 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
5. ทำการทดลองในแต่ละตัวอย่าง 3 ซ้ำ

การคำนวณ % free radical scavenging ทำตามสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ free radical scavenging} = \left| 1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right| \times 100$$

โดย A sample = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ ตัวอย่างใน MeOH เมื่อผสมกับ DPPH

A control = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ MeOH เมื่อผสมกับ DPPH

หลังจากนั้นนำ % free radical scavenging ไป plot กราฟ ในโปรแกรม Prism (Graph Pad Inc, San Diego, USA) เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % (IC 50)

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในสัตว์ทดลอง

ขั้นตอนและวิธีวิจัยทุกอย่างที่นำเสนอในรายงานนี้ได้รับการเห็นชอบและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อวันที่ 21 ต.ค. 2553 (เลขที่โครงการ NU-AE530602) โดยมีลำดับขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

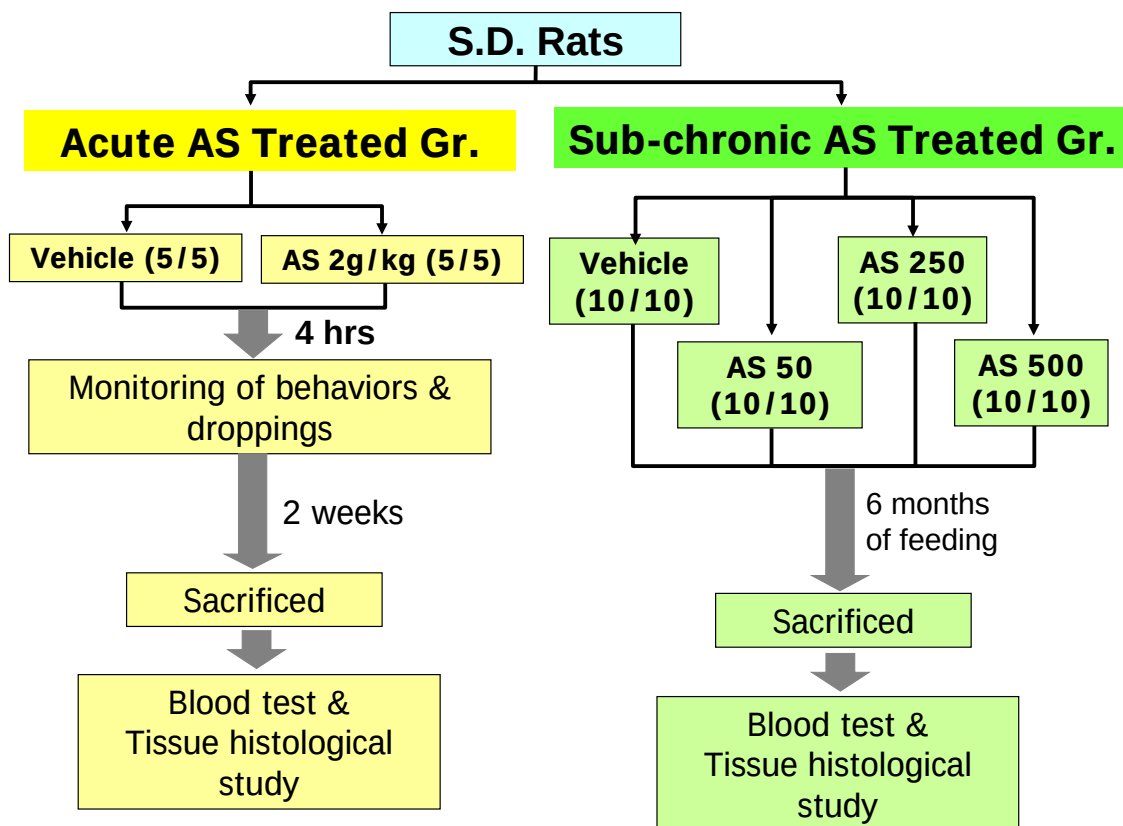
1. สารสกัดจากสมุนไพร

สารสกัดใบกฤษณาที่ใช้ทดสอบได้มาจากขั้นตอนแรกในการเตรียมและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบกฤษณา โดยใช้ใบอ่อนของกฤษณามาต้มและผ่านกระบวนการ Freeze – Drying เพื่อสกัดให้เป็นผงที่สามารถละลายได้ดีในน้ำ ทำการทดสอบโดยใช้ผงของใบกฤษณาที่สกัดได้มาผสมกับน้ำกลั่น เพื่อทำให้เป็นความเข้มข้นต่างๆที่ขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก. โดยการละลายในน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปป้อนให้แก่หนูทดลองโดยตรงทางปาก (oral gavages) ด้วยเข็มกรอกสารปลายมน (Animal feeding needle: cat. No. AH 52-4173, Harvard Apparatus, USA)

2. สัตว์ทดลองและการทดสอบความเป็นพิษ

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็น หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley (S.D.) เพศผู้และเพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ เพศละ 50 ตัว รวมทั้งหมด 100 ตัว (รูปที่ 5) ซึ่งหนูทดลองดังกล่าวจะสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ต.ศาลายา อ.ศาลายา จ.นครปฐม หนูทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกล่องๆ ละ 3-4 ตัวตามความเหมาะสม ใช้วัสดุรองนอนสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ซึ่งจะเปลี่ยนทุกๆ 2 วันหรือเมื่อมีสภาพชื้นแฉะ เลี้ยงในห้องของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ที่ตั้งเวลาปิด-เปิดของแสงไฟในห้องเลี้ยง เป็น 12 ชม (มืด):12 ชม (สว่าง) และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์

การวิจัยในขั้นตอนนี้ จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรก เป็นการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ส่วนที่สอง เป็นการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 แผนผังการดำเนินการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดอย่างเฉียบพลัน (ซ้าย) และความเป็นพิษของสารสกัดแบบเรื้อรัง (ขวา) ค่าในวงเล็บแสดงจำนวนหนูทดลองเพศผู้/เพศเมีย

2.1 การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute Toxicity Test)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันตามเกณฑ์ของ OECD (2001) ทำการแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุม 2 กลุ่มแยกเพศกัน ซึ่งจะถูกให้เฉพาะตัวทำละลาย หรือ vehicle เท่านั้น และมีกลุ่มทดสอบ 2 กลุ่มแยกเพศกัน ซึ่งจะถูกให้สารสกัดใบกฤษณาในขนาด 2000 มก./กก. น้ำหนักตัว ทางปากครั้งเดียว (limit test) โดยสังเกตว่าหนูที่ได้รับสารสกัดแล้วเกิดอาการผิดปกติหรือไม่อย่างไร ดายหรือไม่ และสังเกตพฤติกรรมต่างๆ ไปของหนูทดลองหลังจากป้อนสาร ณ ชั่วโมงที่ 1, 2, 4, และ 6 นอกจากนี้ทำการสังเกตอาการและพฤติกรรมของหนูทุกวันๆละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์

หลังจากสังเกตอาการและพฤติกรรมของหนูเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้ว ในวันที่ 15 ทำการอดอาหารหนูทดลองประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำมา terminate โดยเริ่มจากทำให้หนูสลบลึกด้วยการฉีดยา sedative urethane ขนาด 2 ก/กก. น้ำหนักตัว หลังจากเช็ค withdrawal reflex เพื่อให้มั่นใจว่าหนูสลบลึกดีแล้ว จึงทำการผ่าช่องท้องเพื่อแยกเก็บอวัยวะภายใน เช่น ปอด หัวใจ สมอง ตับ และไต ฯลฯ นำไปชั่งน้ำหนัก และแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน จากนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา general morphology และตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะ (histopathology)

สำหรับเลือดที่เก็บจากหนูแต่ละตัวถูกนำส่งตรวจที่แผนกธนาคารเลือด รพ. มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อหาค่าโลหิตวิทยา (ได้แก่ white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, red blood cell, platelet, hemoglobin, hematocrit) ค่าทางชีวเคมีในเลือด (ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin) และวัดค่าทางชีวเคมี (ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine aminotransferase (ALT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, urea nitrogen (BUN) เป็นต้น) อย่างไรก็ตาม ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ของการสังเกต ถ้ามีการตายเกิดขึ้นกับหนูกลุ่มทดสอบ จะทำการเก็บอวัยวะปอด หัวใจ สมอง ตับ และไตของหนูที่ตาย จะถูกนำไปศึกษา general morphology และพยาธิวิทยา ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.2 การทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (Chronic Toxicity Test)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรังตามเกณฑ์ของ OECD (1998) ใช้หนูทดลองเพศผู้และเพศเมีย จำนวนเพศละ 40 ตัว แบ่งออกเป็นเพศละ 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุมได้รับตัวทำละลาย และกลุ่มทดสอบได้รับสารสกัดใบกฤษณาจำนวนแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 50, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งขนาดที่ใช้ได้ปรับมาจากคำบอกเล่าถึงสรรพคุณของการดื่มชาที่ชงจากใบกฤษณา ได้จากประสบการณ์ตรงของท่านรองเจ้าคณะจังหวัดฯ วัดพระศรีรัตนมหาธาตุวรมหาวิหาร จ.พิษณุโลก ซึ่งจากการคำนวณขนาดที่ท่านรองเจ้าคณะจังหวัดฯ ที่ได้ฉันทาขงกฤษณา คิดเป็นขนาดที่ใช้ชงดื่มต่อวันคือประมาณวันละ 50 มก./กก. น้ำหนักตัว นอกจากนี้มีข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทดสอบผลทางเภสัชวิทยาต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดหยาบจากส่วนเนื้อไม้กฤษณาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อให้ทางปากเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว (Okugawa et al., 1993) และในงานวิจัยที่ศึกษาผลของสารสกัดจากใบกฤษณาในการระบายท้อง (laxative effect) โดยให้ทางปากครั้งเดียวที่ขนาด 100, 300 และ 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว (Hara et al., 2008) และในการทดสอบผลการต้านความเจ็บปวด (antinociceptive activity) และการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ของสารสกัดหยาบจากใบกฤษณาเมื่อให้ทางปากเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 424 และ 848 มก./กก. น้ำหนักตัว (Zhou et al., 2008)

ในงานวิจัยนี้จะทำการป้อนสารสกัดหยาบจากใบกฤษณา ทางปากด้วยเข็มป้อนสารปลายมน (ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ) และกระบอกฉีดขนาด 1 มล. ที่ปริมาตร 0.1 มล./ 100 กรัม น้ำหนักตัว ทำการป้อนวันละครั้ง ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 6 เดือน สังเกตอาการและพฤติกรรมของหนูทุกวัน หลังจากครบ 6 เดือนทำการอดอาหาร ประมาณ 16-18 ชั่วโมง ก่อนนำมาฆ่า ซึ่งเริ่มโดยทำหนูสลบลึกด้วยการฉีดยาสลบ urethane แบบ overdose ขนาด 3 ก./กก. น้ำหนักตัว หลังจากใช้ครีเฟล็กส์ต่างๆ เพื่อให้มั่นใจว่าหนูสลบลึกดีแล้ว ทำการผ่าช่องท้องเพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะภายใน และทำการเก็บอวัยวะ เช่น ปอด

หัวใจ สมอ ดับ และไต ฯลฯ ซึ่งนำหนักรวบรวมและนำไปแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน จากนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา general morphology และตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะ นอกจากนี้จะทำการเก็บเลือดหนูแต่ละตัวส่งตรวจที่ รพ. มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อหาค่าโลหิตวิทยา (ได้แก่ white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, red blood cell, platelet, hemoglobin, hematocrit) ค่าทางชีวเคมีในเลือด (ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin) และวัดค่าทางชีวเคมี (ได้แก่ AST, SGOT, ALT, SGPT, ALP, total bilirubin, BUN เป็นต้น) เช่นเดียวกันกับการดูผลเลือดของการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ

อวัยวะภายในของหนูได้ถูกแยกออกเพื่อชั่ง แล้วนำไปเก็บภายในบรรจุน้ำยา 10 % ฟอรัมาลิน ทันที หลังจากนั้นประมาณ 1 อาทิตย์ จึงนำเนื้อเยื่อมาตัดแต่งเป็นชิ้นตามความเหมาะสม เพื่อเตรียมผ่านและย้อมสีเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

วิธีการอย่างย่อเริ่มจากนำเนื้อเยื่อมา fix ใน fixative คือ formalin 10 % หลังจากนั้น ล้าง fixative ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น แล้วผ่านขบวนการ dehydration ด้วย ethanol ที่เพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้น จาก 50%, 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ จากนั้น ดึง alcohol ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene แล้ว infiltration เนื้อเยื่อ (impregnation) ด้วย paraffin wax เหลว และ Embed เนื้อเยื่อใน mold ซึ่งประกอบด้วย molten paraffin wax (embedded) แล้วปล่อยให้เย็นและแข็งตัว

ทำการตัดเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่อง microtome โดยการตัด paraffin ให้บางประมาณ 5-8 μm และวางส่วนที่ตัดได้บน slide เพื่อนำไปย้อมสีเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากการดึง paraffin (deparaffinized) ออก ด้วย xylene, alcohol และน้ำกลั่น ตามลำดับ จากนั้นนำไปย้อมเนื้อเยื่อโดยใช้สี Hematoxylin & Eosin (H&E) เสร็จแล้ว ปิดแผ่น slide ด้วย mounting medium และ coverslip

การศึกษา morphology ของเนื้อเยื่อทำได้โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) ที่ต่อกล้องบันทึกภาพนิ่งเพื่อถ่ายรูปส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาโดยใช้กำลังขยายขนาด 4x, 10x เพื่อดูลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อเยื่อ และกำลังขยายขนาด 20x เพื่อดูรูปร่างลักษณะและโครงสร้างของเซลล์

4. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ตับ

งานวิจัยนี้ได้เพิ่มเติมการวิเคราะห์เพื่อหาระดับการทำงานของเอนไซม์ตับ 2 ชนิด ได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine transaminase (ALT) เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AST เริ่มต้นจากน้ำหนัก 200 มก. ไป homogenize ใน 400 ml iced-cold PBS (pH 7.4) โดยใช้เครื่อง homogenizer จากนั้น นำเนื้อเยื่อที่ปั่นได้ไป centrifuge ที่ 13,000 g x 10 นาที เก็บ sample ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ในการวิเคราะห์ enzyme activity ได้เตรียม glutamate standard และ reaction mix ตามวิธีที่ระบุไว้ใน AST assay kit (biovision, CA, USA.) โดยการ mix สารต่าง ๆ ได้แก่ AST assay buffer 80 μl , AST enzyme mix 2 μl , Developer 8 μl และ AST substrate 10 μl จากนั้นดูด sample 50 μl ผสมกับ reaction mix ที่ plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm หลังจากนั้น นำ plate ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C 60 นาทีและนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm การคำนวณค่าเทียบได้จาก glutamate standard curve โดยที่หน่วยของ enzyme activity ที่ได้จะอยู่ในรูปของ nmol/min/ml

สำหรับการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ ALT เริ่มต้นจากน้ำหนัก 200 มก. ไป homogenize ใน 400 ml iced-cold PBS (pH 7.4) โดยใช้เครื่อง homogenizer จากนั้น นำไป centrifuge ที่ 13,000 g x 10 นาที เก็บ sample ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C การวิเคราะห์ enzyme activity ให้เตรียม pyruvate standard และ reaction mix ตามวิธีที่ระบุไว้ใน ALT assay kit (biovision, CA, USA.) โดยการ mix สารต่าง ๆ ได้แก่ ALT assay buffer 80 μl , ALT enzyme mix 2 μl , Developer 8 μl , ALT substrate 10 μl , pipette sample 50 μl , ผสมกับ reaction mix, ที่ plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm หลังจากนั้น นำ plate ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C 60 นาทีและนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm การคำนวณค่าเทียบได้จาก pyruvate standard curve โดยที่หน่วยของ enzyme activity ที่ได้จะอยู่ในรูปของ nmol/min/ml

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละกลุ่มถูกนำมาเปรียบเทียบเพื่อดูความแตกต่างโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) เมื่อพบว่าข้อมูลคู่ใดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจึงทำการทดสอบต่อไปด้วย Dunnett's test โดยเปรียบเทียบกับค่าของกลุ่มควบคุม หรือใช้ Student's t-test ทดสอบในกรณีที่เปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ งานวิจัยนี้ได้ตั้งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $\alpha = 0.05$ และโปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ SigmaStat version 3.0 (SPSS, USA)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเตรียมและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบกฤษณา

1. ผลการเตรียมสารสกัด Freeze-dried ของใบกฤษณา

สารสกัดใบกฤษณาที่เตรียมขึ้นในการศึกษาค้างนี้ เป็นสารสกัดที่อยู่ในรูปแบบที่มีการใช้โดยพระธรรมเสนาบดี ร่องเจ้าคณะภาค 5 เจ้าอาวาสวัดพระศรีรัตนมหาธาตุวรมหาวิหาร จังหวัดพิษณุโลก กล่าวคือ ใช้ยอดใบกฤษณา ทำชาชง โดยผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสกัดน้ำของใบกฤษณาโดยการสกัดในน้ำร้อนเช่นเดียวกับการใช้ชาชงใบกฤษณา แต่ผู้วิจัยใช้กระบวนการทำให้สารสกัดจากน้ำแห้งโดยวิธี freeze dry และ spray dry จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักพืชแห้งพบว่า เวลาที่ใช้ในการสกัดทั้งสองวิธีที่เท่ากัน แต่การสกัดด้วยวิธี freeze dry (27.05 %) นั้นให้ปริมาณสารสกัดที่มากกว่าวิธี spray dry (18.53%) จึงเลือกใช้วิธีนี้ในการเตรียมสารสกัดใบกฤษณา แม้จะใช้เวลาในการทำแห้งนานกว่า ซึ่งประมาณ 1 วันก็ตาม

ตารางที่ 3 % yield ของสารสกัดน้ำที่ได้จากการ spray dry และ freeze dry

วิธีการ	น้ำหนักแห้ง	นน.สารสกัด	% yield	เวลาที่ใช้
freeze dry	292 g	79.00 g	27.05	72 ชม.
spray dry	410 g	76.09 g	18.53	42 ชม.

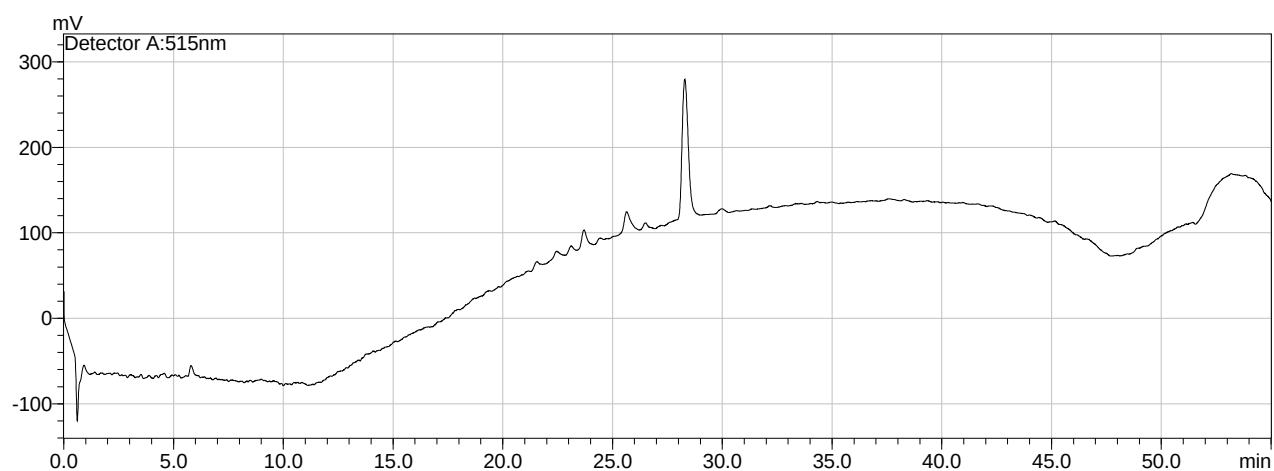
จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดลองหาเวลาการสกัดที่เหมาะสม โดยนำใบกฤษณามาสกัดในน้ำร้อน โดยใช้เวลาการสกัดแตกต่างกันตั้งแต่ 10 นาที ถึง 60 นาที พบว่าเวลาการสกัดที่มากขึ้น ทำให้ได้ %yield สูงขึ้นเล็กน้อย แต่ช่วงเวลา 30 นาทีและ 60 นาที ให้ %yield ไม่แตกต่างกันมาก เวลาในการสกัดด้วยน้ำร้อน 30 นาที จึงน่าที่จะเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดใบกฤษณา

ตารางที่ 4 % yield ของสารสกัดที่ได้จากการ freeze dry ที่เวลาต่างกัน

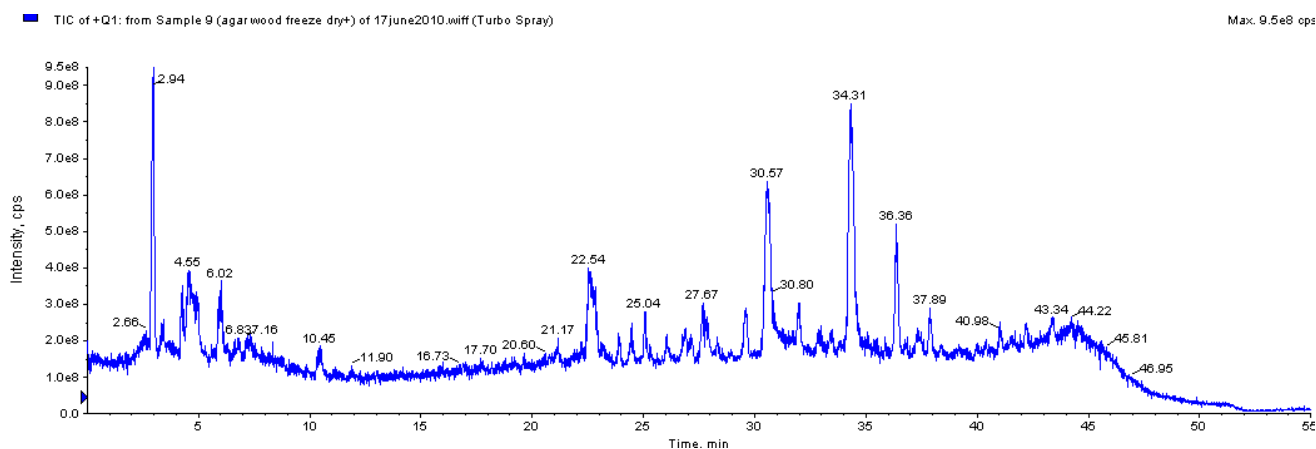
เวลาในการหมัก(นาท)	น้ำหนักผงพืช(g)	น้ำหนักสารสกัด freeze dry(g)	%yield
10	400	95.80	23.95
20	100	24.78	24.78
30	100	29.50	29.50
60	100	31.13	31.13

2. ผลการหาสารต้านอนุมูลอิสระ ในสารสกัดน้ำใบกฤษณาด้วยวิธี LC-ESI-MS coupled with DPPH assay

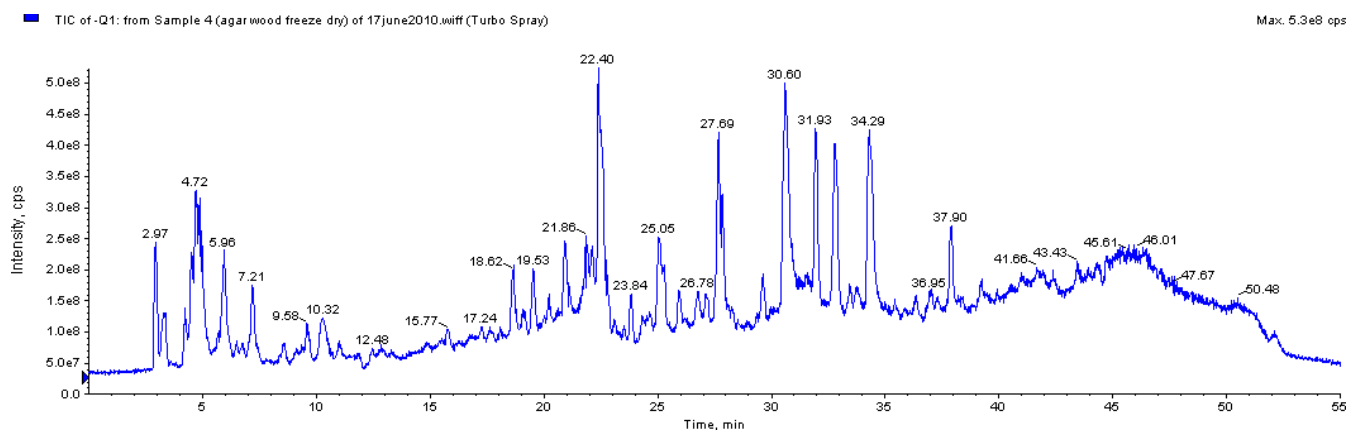
ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยต่อวิธีวิเคราะห์ DPPH assay เข้ากับ HPLC-MS (LC/MS/MS online coupling with DPPH assay) เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารออกฤทธิ์ ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 6 พบ peak ที่น่าสนใจของสารต้านอนุมูลอิสระ และได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็น Aquilarinoside , Iriflophenone glycoside และ mangiferin ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 7 โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทำโดยการตรวจสอบกับรายงานที่เคยมีมา (Oj et al., 2007 และ Bock et al., 2008) สำหรับ mangiferin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสารสกัด โดยดูจาก peak ที่เกิดขึ้นสูงที่สุด ได้มีการยืนยันการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทียบกับสารมาตรฐานด้วย



b)



c)

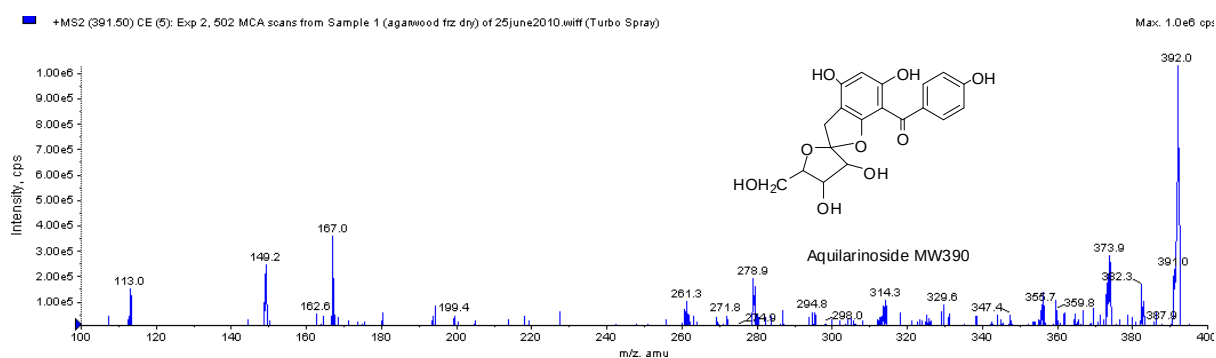


รูปที่ 6 LC/MS/MS online coupling with DPPH chromatograms ของสารสกัดน้ำของใบกฤษณา a) จาก DPPH detector b) จาก MS detector (Total ion count) ใน positive mode C) จาก MS detector (Total ion count) ใน negative mode

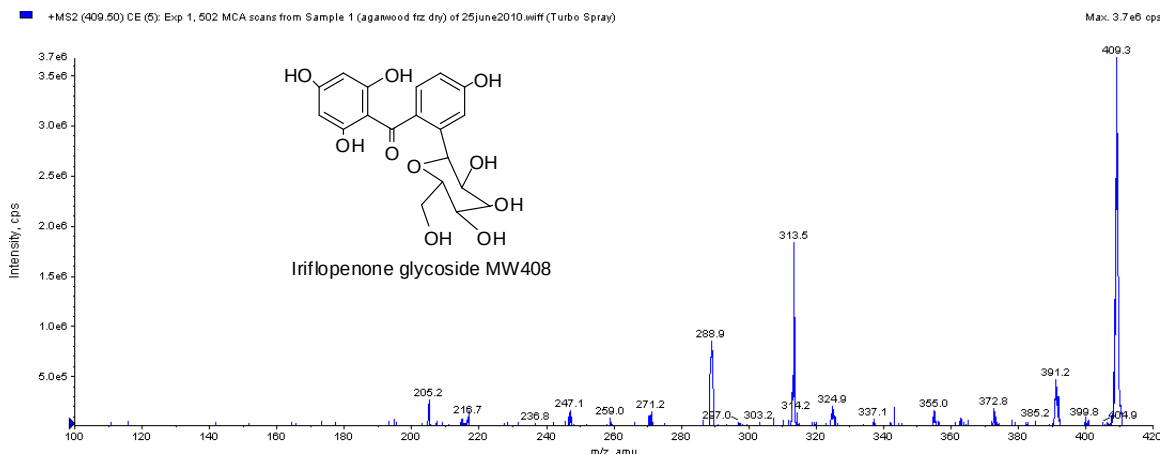
a)

ตารางที่ 5 MS และ MS/MS ของ peak ใน chromatogram ของสารสกัดน้ำในกฤษณาที่ได้จาก LC-ESI-MS coupled with DPPH assay และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

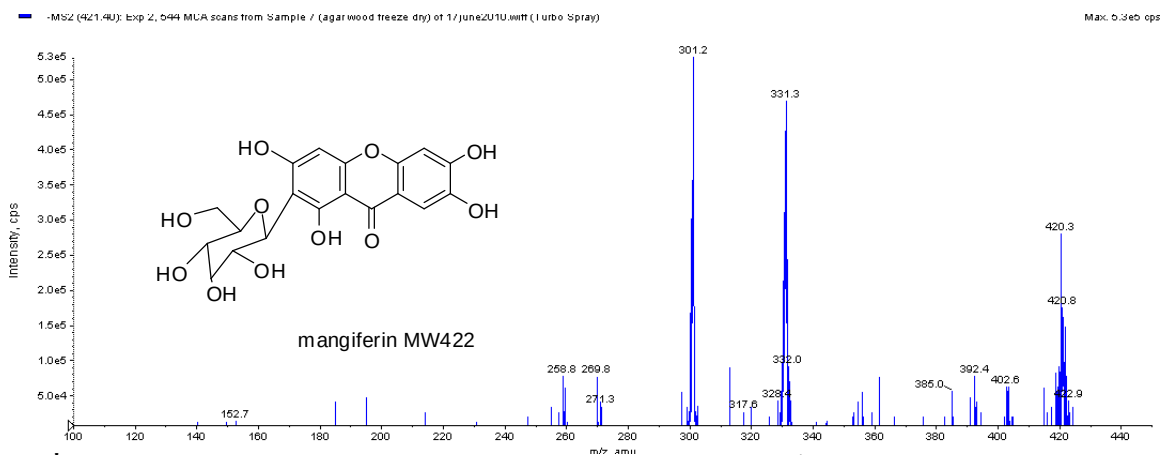
Peak no.	t _R	MS	MS/MS	Tentative identification
1	18.7	841.6 (-)	823.3,722.0,433.0,407.2	unknown
2	19.0	841.6 (-)	823.3,722.0,433.0,407.2	
3	21.0	841.6 (-)	823.3,722.0,433.0,407.2	
4	21.6	841.6 (-)	823.3,722.0,433.0,407.2	
5	25.1	841.6 (-)	823.3,722.0,433.0,407.2	
6	22.5	391.5(+)	373.9,278.9,261.3	Aquilarinoside
7	22.5	407.5(-)	317.0,287.2,244.5	Iriflophenone glycoside
	22.5	409.5(+)	313.5,288.9,247.1	
8	27.7	421.4(-)	331.3,301.2,269.8,258.8	mangiferin
		423.4(+)	405.0,357.0,327.0,302.8	



รูปที่ 7 MS ของ peak ที่นาที่ 22.5 ใน chromatogram ของ LC-ESI-MS coupled with DPPH assay



รูปที่ 8 MS ของ peak ที่นาที่ที่ 22.5 ใน chromatogram ของ LC-ESI-MS coupled with DPPH assay



รูปที่ 9 MS ของ peak ที่นาที่ที่ 27.7 ใน chromatogram ของสารสกัดน้ำใบกฤษณาที่ได้จาก LC-ESI-MS coupled with DPPH assay

3.ผลการหาปริมาณ Mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณาโดยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MSMS ที่ต่อเนื่องกับการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay) พบว่า สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารหลักในใบกฤษณา คือ mangiferin ผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ปริมาณสาร mangiferin ในใบกฤษณาด้วยวิธี HPLC จากการทำ method validation พบว่า เมื่อทำการศึกษา

ช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารมาตรฐาน mangiferin ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 4.6 - 150 $\mu\text{g/ml}$ มีค่า $r^2 = 0.9990$ ดังรูปที่ 10

Limit of detection (LOD) และ limit of quantification (LOQ)

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุด (LOD) ของสาร mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณาที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ค่า LOD ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นตอนการทำ และ LOQ คือ 4.68 $\mu\text{g/ml}$

Intraday และ Interday precision

จากการวิเคราะห์สารตัวอย่าง mangiferin ที่อยู่ในสารสกัดใบกฤษณา ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของ calibration curve คือ 35.5, 75.0, และ 150.0 $\mu\text{g/ml}$ เตรียมความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday) และระหว่างวัน (interday) คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน(% CV) ได้ดังตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7

ตารางที่ 6 Intraday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร mangiferin ในตัวอย่างสารสกัดใบกฤษณา (n=3)

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% CV
150.0	3.43
75.0	2.78
35.5	1.61

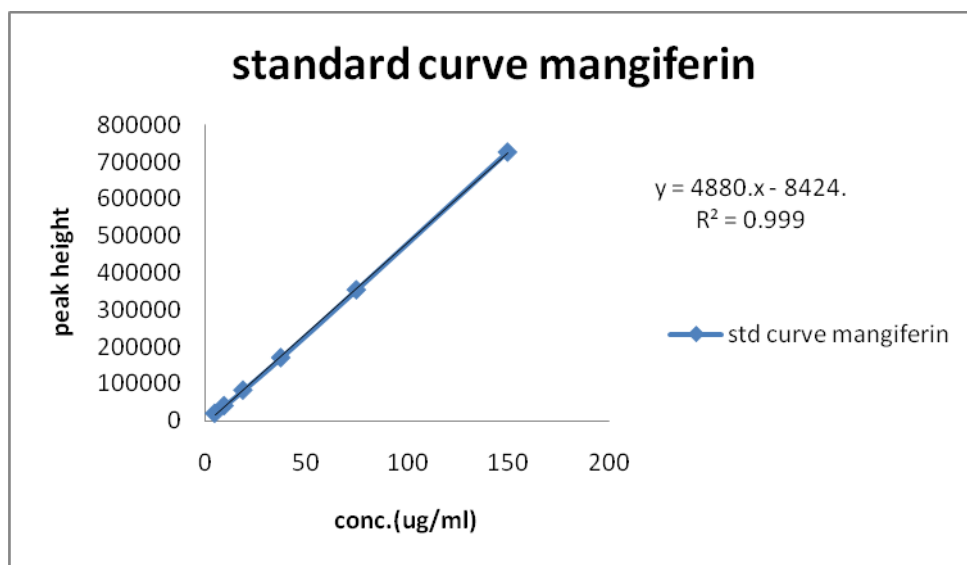
ตารางที่ 7 Interday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร mangiferin ในตัวอย่างสารสกัดใบกฤษณา (n=3)

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% CV
150.0	3.66
75.0	3.03
35.5	2.13

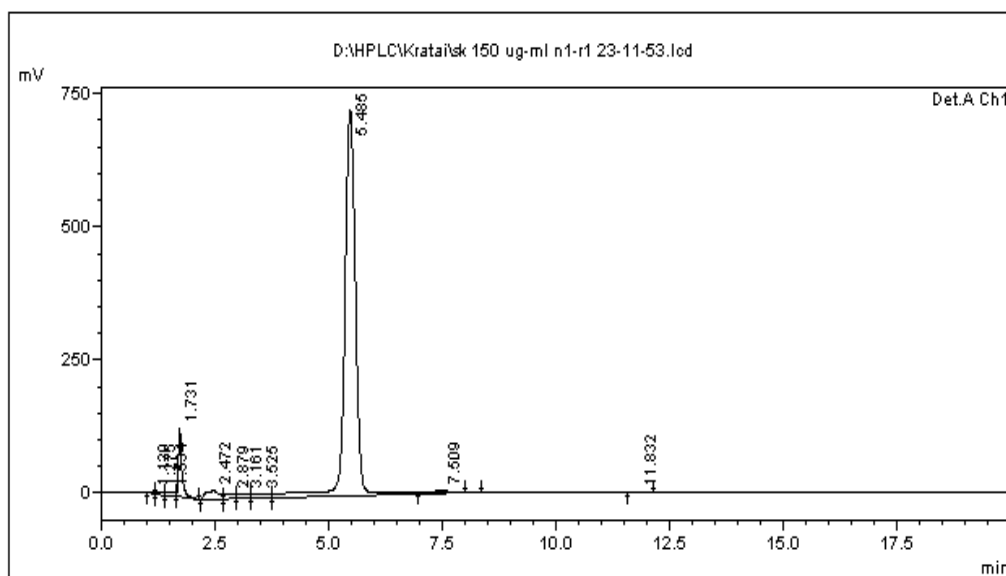
ปริมาณ mangiferin

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณาด้วยวิธี HPLC โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 nm ได้ตัวอย่างโครมาโตแกรมดังรูปที่ 11 จึงได้วิเคราะห์ปริมาณ % mangiferin จากกราฟ

มาตรฐาน พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบกฤษณา 0.05 mg/ml มีปริมาณ mangiferin เท่ากับ 6.94 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ $13.88 \pm 0.03 \%$



รูปที่ 10 standard curve ของสารมาตรฐาน mangiferin ที่มีความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 11 ตัวอย่าง chromatogram ของสารสกัดใบกฤษณา ที่มีความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$

4. ผลการวิเคราะห์ total polyphenol

การทดลองหาปริมาณ total polyphenol โดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าที่ได้คำนวณเป็น gallic equivalent ผลการทดลองที่แสดงได้เป็นค่า total polyphenol เปรียบเทียบกับ gallic acid 1 กรัมใน 1 กิโลกรัมตัวอย่าง (gGA/kg) โดยคำนวณจาก calibration curve (รูปที่ 12) ได้ผลการ

$$\text{total polyphenol eq. gallic acid (gGA/kg)} = \frac{y + 0.001}{36.57} \times 1000$$

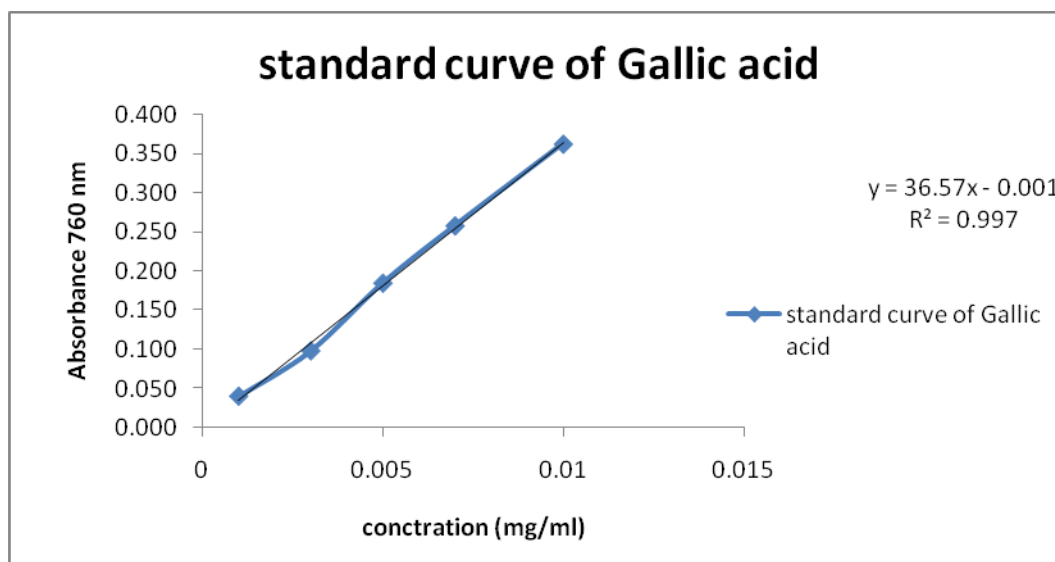
เมื่อ $y = A - B$

โดยที่ $A =$ ค่า absorbance ที่วัดได้

$B =$ ค่า absorbance ของ control

*** control = 0.5 ml 70% MeOH + 2.5 Folin reagent + 2.0 ml Na_2CO_3

$a =$ ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)



รูปที่ 12 Standard curve ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดลองหาปริมาณ Total polyphenol ของใบกฤษณา (จากการสกัดด้วย 70%MeOH) พบว่า ใบกฤษณา มีปริมาณ total polyphenol เทียบเท่ากับ gallic acid 72.10 ± 4.20 g ในผงพืช 1 kg เทียบกับใบชาเขียว ซึ่งเป็นสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักดีว่ามีปริมาณ total polyphenol สูง โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกัน

พบว่าใบชาเขียวมีปริมาณ total polyphenol เมื่อเทียบกับ Gallic acid เท่ากับ $57.06 \pm 9.15\text{g}$ ในผงพืช 1 kg นั้น
คือมี ปริมาณ Total polyphenol ใกล้เคียงกับใบกฤษณา

5.ผลการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกฤษณาและสาร mangiferin โดยใช้ DPPH assay (Kim *et al.*, 1999; Nuengchamnong *et al.*, 2005) เทียบกับสาร positive control คือ สารสกัดชาเขียว และ trolox และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % (IC 50) ดังแสดงในรูปที่ 13-16

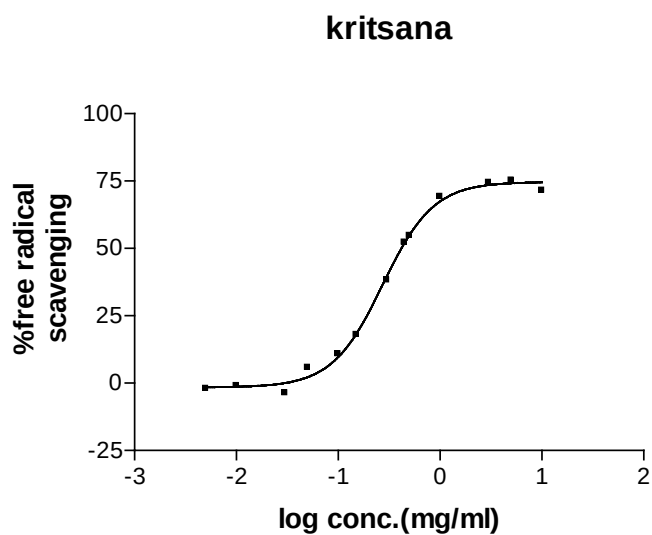
จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 ใบกฤษณาแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ IC 50 $172.63 \pm 59.35 \mu\text{g}$ ใบแห้ง/ml ซึ่งเมื่อทำการสกัดใบกฤษณาด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือน้ำ Hexane และ Ethanol พบว่า สารสกัดน้ำที่ถูกทำให้แห้งโดยวิธี freeze dry และ spray dry มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสารสกัด ethanol คืออยู่ในช่วง 30-50 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดชาเขียวที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็น สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเพียงประมาณ 3-5 เท่า โดยสาร mangiferin ซึ่งเป็นสารประกอบหลักใน ใบกฤษณา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ trolox คือมีค่า IC 50 ประมาณ 5 $\mu\text{g/ml}$ เป็นที่ทราบกันดีว่า สารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ต่อร่างกาย และช่วยในการป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมต่างๆ การที่สาร mangiferin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีปริมาณในสารสกัดใบกฤษณาสูงถึงมากกว่า 10 % จึงควรที่จะใช้ สาร mangiferin นี้ เป็นสาร marker ในการ standardize สารสกัดกฤษณาที่จะนำไปทำการทดลองทางเภสัช วิทยา หรือพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ทางยาหรือเครื่องสำอางต่อไป

ตารางที่ 8 ฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างจากกฤษณาและสารมาตรฐาน trolox ค่าที่แสดงคือค่า ค่า IC 50 เฉลี่ย $\pm$ SD จาก 3 การทดลอง

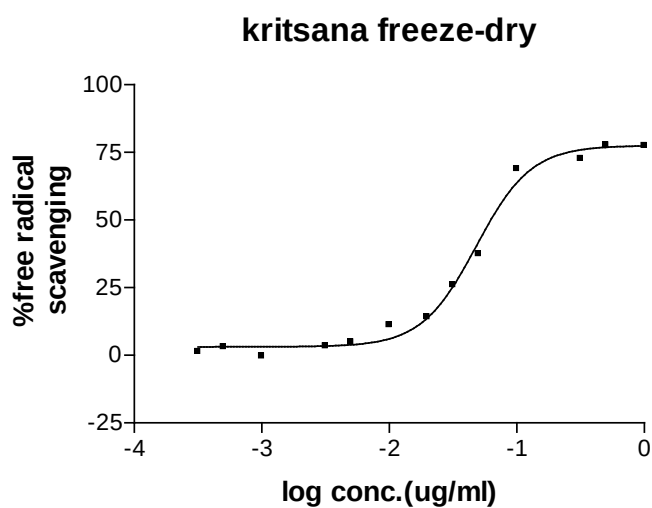
ตัวอย่าง	IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)
ใบกฤษณา	172.63 ± 59.35
สารสกัดน้ำจากใบกฤษณา (freeze-dry)	46.3 ± 2.60
สารสกัดน้ำจากใบกฤษณา (spray-dry)	38.9 ± 17.40
สารสกัด Hexane จากใบกฤษณา	412.13 ± 18.48
สารสกัด Ethanol จากใบกฤษณา	32.07 ± 3.49
สารสกัดชาเขียว**	11.97 ± 0.40
mangiferin	5.33 ± 0.51
สารมาตรฐาน trolox	$4.84 \pm 1.43^*$

* ค่าเฉลี่ยจาก 6 การทดลอง

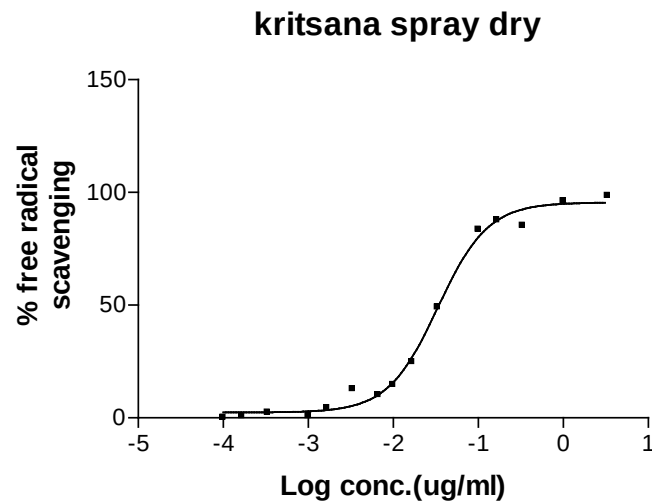
** วิธีการเตรียมตัวอย่างแสดงในหัวข้อ 4.1 หน้า 15



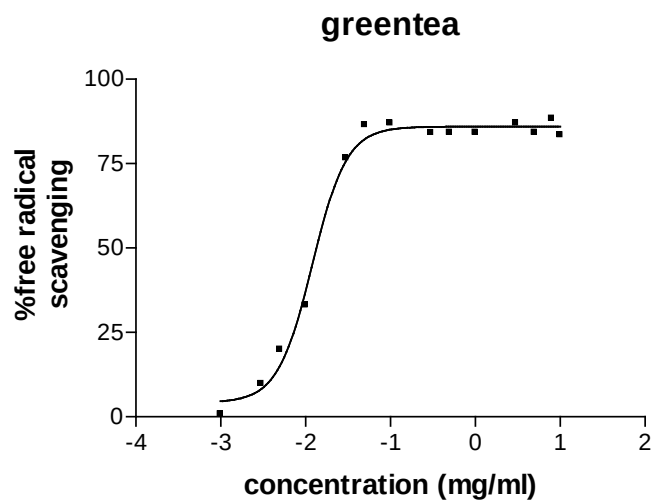
รูปที่ 13 การยับยั้งอนุมูลอิสระของใบกฤษณาแห้ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ



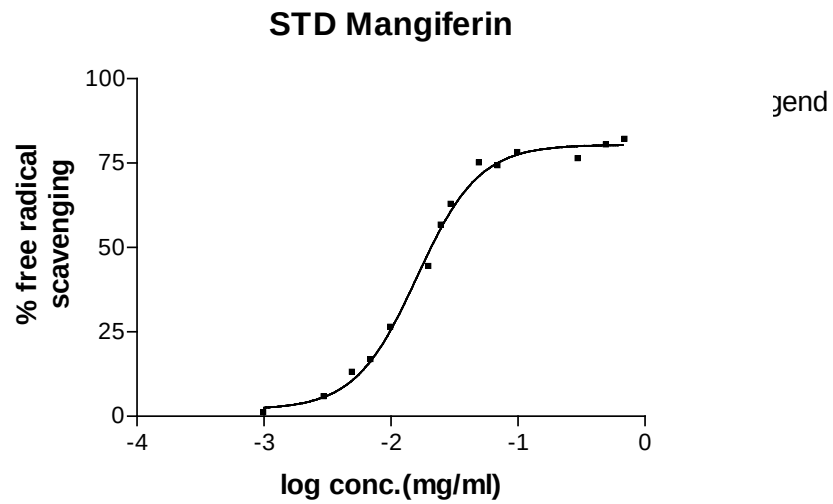
รูปที่ 14 การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกฤษณาที่นำไป freeze-dry ที่ความเข้มข้นต่างๆ



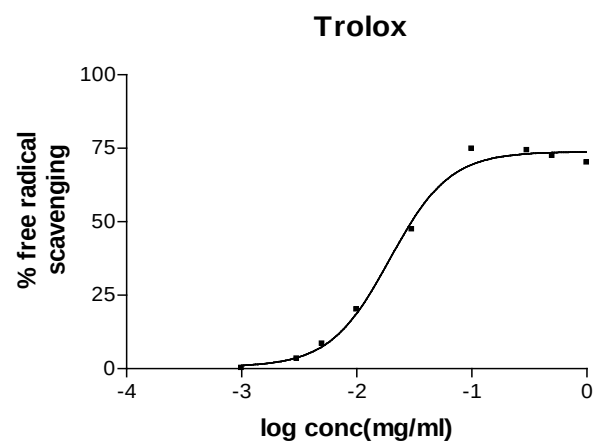
รูปที่ 15 การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกฤษณาที่ถูกลำไปspray-dry ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 16 การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดชาเขียว ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 17 การยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร mangiferin ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 18 การยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในสัตว์ทดลอง

1. ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดจากใบกฤษณา

การทดลองนี้เป็นการสังเกตความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาภายหลังที่หนูทดลองได้รับสารสกัดขนาด 2 ก./กก. เพียงครั้งเดียว ระยะเวลาที่ทำการสังเกตเท่ากับ 14 วัน ซึ่งจากผลการทดลองไม่พบว่ามีหนูทดลองตัวใดแสดงอาการผิดปกติทางพฤติกรรมและไม่พบว่าการตายในหนูทดลองทั้งสองเพศอันเกิดจากผลของสารสกัดจากใบกฤษณา ดังสรุปผลในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 อัตราการตายของหนูในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดภายใน 14 วัน

Animal group	Fatality ratio [#] (n/N)		Total (n/N)
	Male	Female	
Vehicle (Control)	0/5	0/5	0/10
AS2000 mg/kg	0/5	0/5	0/10

[#] จำนวนหนูทดลองที่ตาย (n)/จำนวนหนูทดลองทั้งหมดในกลุ่ม (N)

1.1 พฤติกรรมการขับถ่ายหลังจากได้รับสารสกัดจากใบกฤษณาขนาด 2 ก./กก.

ผลการทดลองนี้เป็นการสังเกตพฤติกรรมการขับถ่าย ดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11 ในหนูกลุ่มควบคุมของทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่พบความผิดปกติใดๆ ส่วนในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในชั่วโมงที่ 1 และ 2 ไม่พบความผิดปกติ ส่วนในชั่วโมงที่ 3 และ 4 พบว่าการถ่ายอุจจาระมากขึ้นโดยไม่ทำให้ท้องเสีย และในเพศผู้ชั่วโมงที่ 1 และ 2 นั้น พบว่าการถ่ายอุจจาระเพิ่มขึ้นโดยไม่ทำให้ท้องเสีย ต่อมาในชั่วโมงที่ 3 และ 4 พบว่าการถ่ายอุจจาระนิ่ม (soft stool) อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อได้รับสารสกัดจากใบกฤษณาในปริมาณมากเพียงครั้งเดียว อาจช่วยกระตุ้นระบบขับถ่ายในหนูทดลองให้เพิ่มมากขึ้นหลังจากได้รับสารสกัดไม่กี่ชั่วโมง

ตารางที่ 10 ผลของการสังเกตพฤติกรรมการขับถ่ายของหนูทดลองเพศเมียภายในช่วงเวลา 4 ชม. หลังจากที่ได้รับน้ำ (Control) หรือสารสกัดใบกฤษณา (AS) ที่ความเข้มข้น 2 ก./กก. เพียงครั้งเดียว

Female rats	Number of feces (pieces)			
	1 st hr	2 nd hr	3 rd hr	4 th hr
Control 1	-	-	-	-
Control 2	-	-	-	-
Control 3	2	-	-	-
Control 4	-	-	-	-
Control 5	3	-	-	-
AS 1	-	-	1	-
AS 2	-	4	1	1 soft stool
AS 3	1	-	3	1 soft stool
AS 4	-	-	-	1 soft stool
AS 5	-	-	-	-
AS 6	-	-	1 soft stool	-

ตารางที่ 11 แสดงผลของการสังเกตพฤติกรรมการขับถ่ายของหนูทดลองเพศผู้ภายในช่วงเวลา 4 ชม. หลังจากที่ได้รับน้ำ (Cont.) หรือสารสกัดใบกฤษณา (AS) ที่ความเข้มข้น 2 ก./กก. เพียงครั้งเดียว

Male rats	Number of feces (pieces)			
	1 st hr	2 nd hr	3 rd hr	4 th hr
Cont 1	-	-	-	-
Cont 2	5	-	-	-
Cont 3	4	1	-	-
Cont 4	-	-	-	-
Cont 5	-	-	-	-
AS 1	5	1	-	4
AS 2	4	1	2	1 soft stool

AS 3	5	-	1 soft stool	-
AS 4	-	-	1	1
AS 5	5	2	-	-

1.2 ผลการเปลี่ยนแปลงขนาดและน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูทดลองหลังจากได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 2 ก./กก.

จากผลการชั่งน้ำหนักของอวัยวะภายในของหนูทุกเพศและกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการที่หนูได้รับสารสกัดใบกฤษณาในขนาด 2 ก./กก. ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเติบโตของอวัยวะภายในอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$; unpaired t-test) เช่น สมอง หัวใจ ปอด ตับ ม้าม ไต และมดลูกกับรังไข่ในหนูเพศเมีย (ตารางที่ 12) หรือต่อมลูกหมากกับลูกอัณฑะในหนูเพศผู้ (ตารางที่ 13) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศเมียมกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

Female Rats	Vehicle Control			AS (2 g/kg)	
	mean	SEM		mean	SEM
Body Weight (g)	252.71 ± 7.47			249.01 ± 9.78	
Tissue Wet Weight (g/100 g b.w.)					
Brain	1.84 ± 0.05			1.85 ± 0.03	
Heart	1.10 ± 0.03			1.12 ± 0.07	
Lungs	1.79 ± 0.21			1.62 ± 0.16	
Liver	7.26 ± 0.38			7.17 ± 0.49	
Spleen	0.66 ± 0.04			0.69 ± 0.05	
Kidneys	1.72 ± 0.03			1.80 ± 0.05	
Stomach & Deodenum	2.39 ± 0.23			2.68 ± 0.24	
Ovaries & Uterus	1.74 ± 0.50			1.05 ± 0.18	

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบ
กฤษณาในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

Male Rats	Vehicle Control		AS (2 g/kg)	
	mean	SEM	mean	SEM
Body Weight (g)	397.46	± 23.31	398.44	± 18.06
Tissue Wet Weight (g/100 g b.w.)				
Brain	1.92	± 0.07	2.00	± 0.04
Heart	1.45	± 0.05	1.43	± 0.06
Lungs	1.75	± 0.08	1.75	± 0.10
Liver	10.82	± 0.36	12.09	± 0.61
Spleen	0.87	± 0.03	0.83	± 0.05
Kidneys	2.66	± 0.14	2.84	± 0.08
Stomach & Deodenum	2.45	± 0.10	2.37	± 0.11
Testes	3.71	± 0.14	3.61	± 0.21
Prostage gland	2.58	± 0.22	2.44	± 0.32

1.3 ผลการตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีต่างๆ

จากผลการตรวจเลือดพบว่า ค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีของเลือดในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ไม่พบความแตกต่างของทั้งจำนวนเม็ดเลือดชนิดต่างๆและค่าทางชีวเคมีของเลือด เมื่อเปรียบเทียบกับ หนูกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15 จากผลการตรวจเลือด แต่ในหนูตัวเมียที่ได้รับสารสกัดใบ กฤษณามีการเพิ่มขึ้นของ WBC, PLT, PCT, neutrophil, lymphocyte เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ค่าที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้ยังคงอยู่ในช่วงปกติ เช่นเดียวกับค่าทางชีวเคมีของเลือด มีบางค่าที่พบว่าหนูที่ได้รับ สารสกัดใบกฤษณามีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$; unpaired t-test) เช่น ค่า Creatinine, Cholesterol, Total protein, Albumin และ HDL-C อย่างไรก็ตาม ค่าที่ลดต่ำลงเหล่านี้ยังถือว่าอยู่ในช่วงปกติ

1.4 ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ดังแสดงในรูปที่ 19 ซึ่งเป็นภาพถ่ายจากสไลด์ของเนื้อเยื่อตับ (1) หัวใจ (2) ตับอ่อน (3) ลำไส้เล็ก (4) ในหนูกลุ่มควบคุม (control) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) เพียงครั้งเดียว ด้วยขนาด 2 ก./กก. น้ำหนักตัว และจากรูปที่ 3 แสดงเนื้อเยื่อไต (6) ปอด (7) ม้าม (8) และอวัยวะในหนูเพศผู้ (9) หรือ มดลูกใน

หนูเพศเมีย (10) เปรียบเทียบระหว่างหนูเพศผู้กลุ่มควบคุม (Male Control) หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด (Male AS-Treated) หนูเพศเมียกลุ่มควบคุม (Female Control) และหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (Female AS-Treated) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วไม่พบความผิดปกติของรูปร่างของเซลล์ใดๆ ของเนื้อเยื่อดังกล่าว ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด

ตารางที่ 14 ผลการตรวจนับเม็ดเลือดในหนูกลุ่มควบคุม (control) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) ขนาด 2 ก./กก.

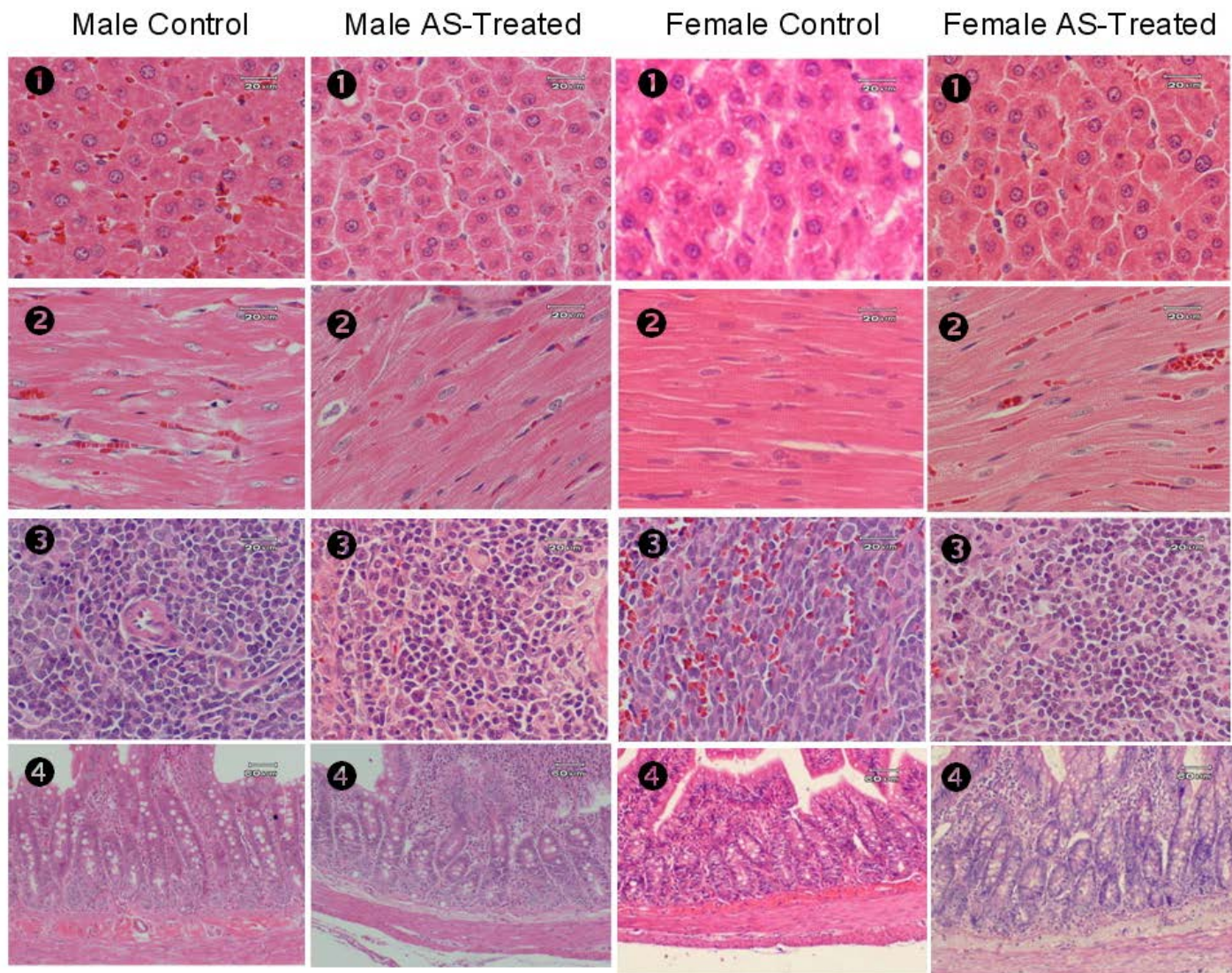
หมายเหตุ : * = $P < 0.05$, unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 15 ผลการตรวจค่าทางชีวเคมีของเลือดในหนูกลุ่มควบคุม (control) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) ขนาด 2 ก./กก.

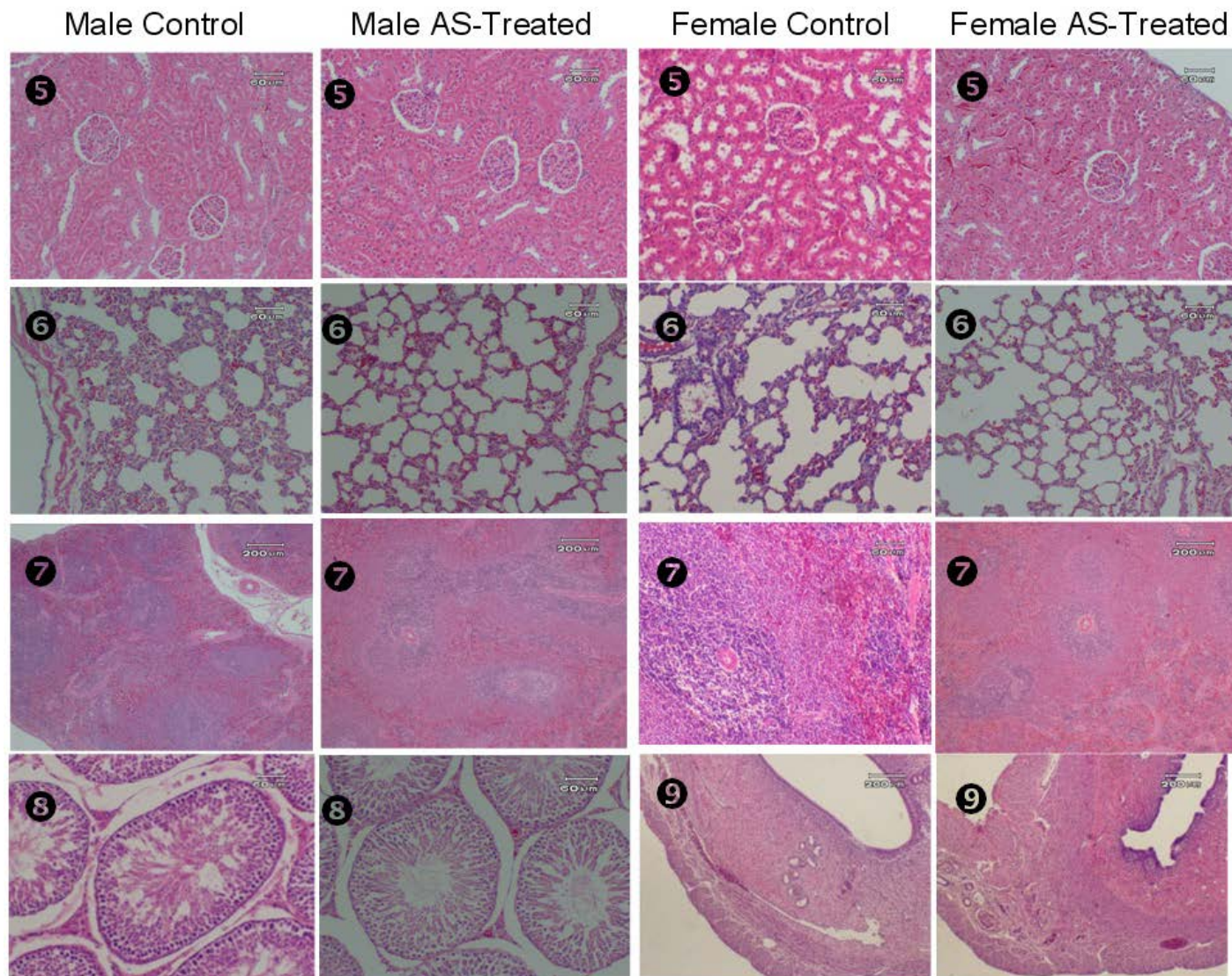
		Creatinine	Cholesterol	Triglyceride	Total protein	Albumin	Globulin	Billirubin	AST	ALT	ALP	LDL	HDL-C	T-Bill	BUN
Control (M)	Mean	0.6	85.8	64.2	6.4	3.8	2.4	0.0	36.5	10.9	75.6	14.2	57.4	0.1	28.6
	S.D.	0.1	3.5	14.6	0.3	0.1	0.1	0.0	13.8	60.9	4.3	2.3	1.7	0.1	2.6
AS 2 g/kg (M)	Mean	0.7	76*	62.0	5.9*	3.6*	2.3	0.0	49.0	12.0	80.0	15.2	48.6*	0.2	30.6
	S.D.	0.2	4.8	22.7	0.2	0.0	0.2	0.0	31.1	7.0	8.2	5.1	5.4	0.1	3.0
Control (F)	Mean	0.6	92.6	46.6	6.4	4.2	1.8	0.3	23.0	4.2	64.4	14.7	68.8	0.1	28.7
	S.D.	0.0	7.5	7.0	0.5	0.1	0.1	0.1	4.5	6.2	3.5	5	3.9	0.0	1.2
AS 2 g/kg (F)	Mean	0.5*	93.8	37.0	5.5*	3.9*	1.6	0.2	18.2	4.5	62.2	19.6	66.8	0.1	27.4
	S.D.	0.1	12.1	7.1	0.2	0.2	0.1	0.1	3.8	7.1	4.3	4.3	7.1	0.0	3.0

หมายเหตุ : * = P < 0.05, unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

รูปที่ 19 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนตับ (1) หัวใจ (2) ตับอ่อน (3) ลำไส้เล็ก (4) ในหนูกลุ่มควบคุม (control) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) ขนาด 2 ก./กก.



รูปที่ 20 ภาพถ่าย histology ของเนื้อเยื่อส่วนไต (5) ปอด (6) ม้าม (7) และอณฑะ (8) ในหนูเพศผู้ หรือมดลูก (9) ในหนูเพศเมีย



2. การศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

ในการทดลองนี้ หนูทั้งสองเพศได้รับการป้อนตัวทำละลายหรือสารสกัดใบกฤษณาอย่างต่อเนื่องทุกวันเป็นเวลา 6 เดือน จำนวนหนูทดลองในตอนตั้งต้นของแต่ละกลุ่มเท่ากับ 9-10 ตัว โดยมีอายุเริ่มต้นที่ 8 สัปดาห์ ซึ่งภายหลังการป้อนสารสกัดนาน 6 เดือน ผู้วิจัยไม่พบว่ามีหนูทดลองตัวใดตายเนื่องจากความเป็นพิษของสารสกัด (ตารางที่ 16)

2.1 ผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย

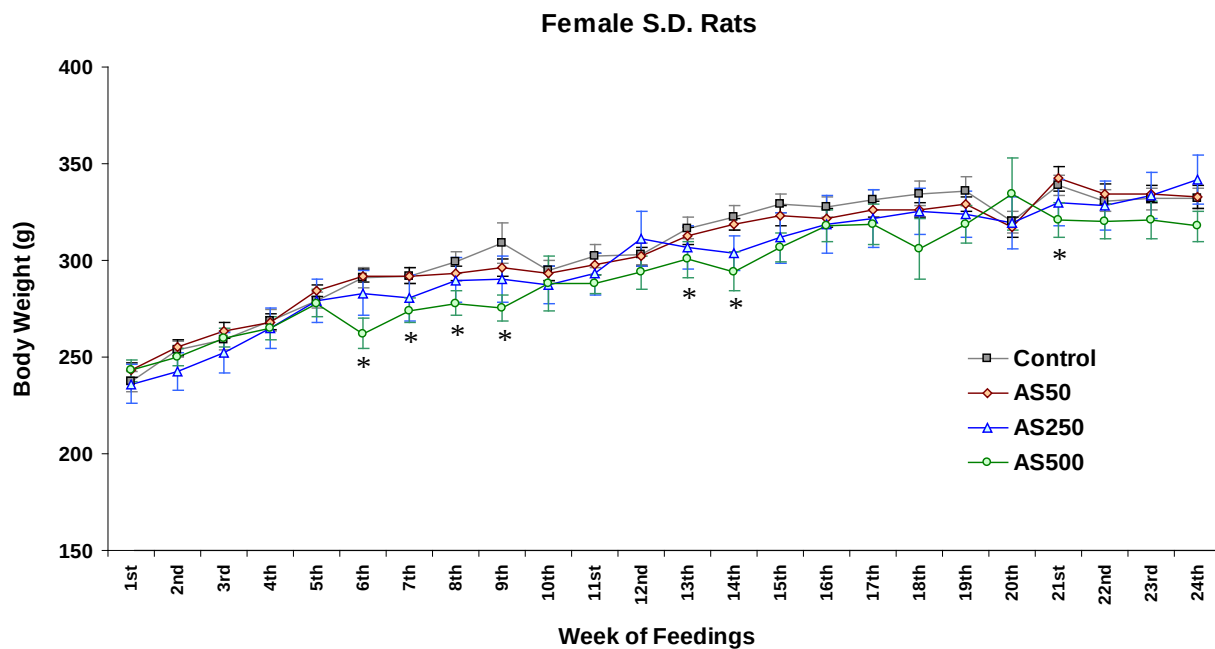
สำหรับหนูเพศเมีย (รูปที่ 21) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ($\pm$ s.e.m.) เริ่มต้นในกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น (Vehicle control) มีค่าเท่ากับ 237.43 ± 5.1 กรัม, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 50 มก. /กก. (AS50) มีค่าเท่ากับ 243.2 ± 3.9 กรัม, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 250 มก. /กก. (AS250) มีค่าเท่ากับ 236.1 ± 10.2 กรัม, และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 500 มก. /กก. (AS500) มีค่าเท่ากับ 243.1 ± 5.4 กรัม ตามลำดับ

สำหรับหนูเพศผู้ (รูปที่ 22) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ($\pm$ s.e.m.) เริ่มต้นในกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น (Vehicle control) มีค่าเท่ากับ 320.95 ± 10.34 กรัม, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 50 มก. /กก. (AS50) มีค่าเท่ากับ 320.63 ± 7.73 กรัม, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 250 มก. /กก. (AS250) มีค่าเท่ากับ 331.17 ± 5.67 กรัม, และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 500 มก. /กก. (AS500) มีค่าเท่ากับ 333.19 ± 8.92 กรัม ซึ่งพบว่าเฉพาะหนูกลุ่ม AS500 เท่านั้นที่มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงสัปดาห์ที่ 6-9 และ 13-14 ($P < 0.05$; unpaired t-test)

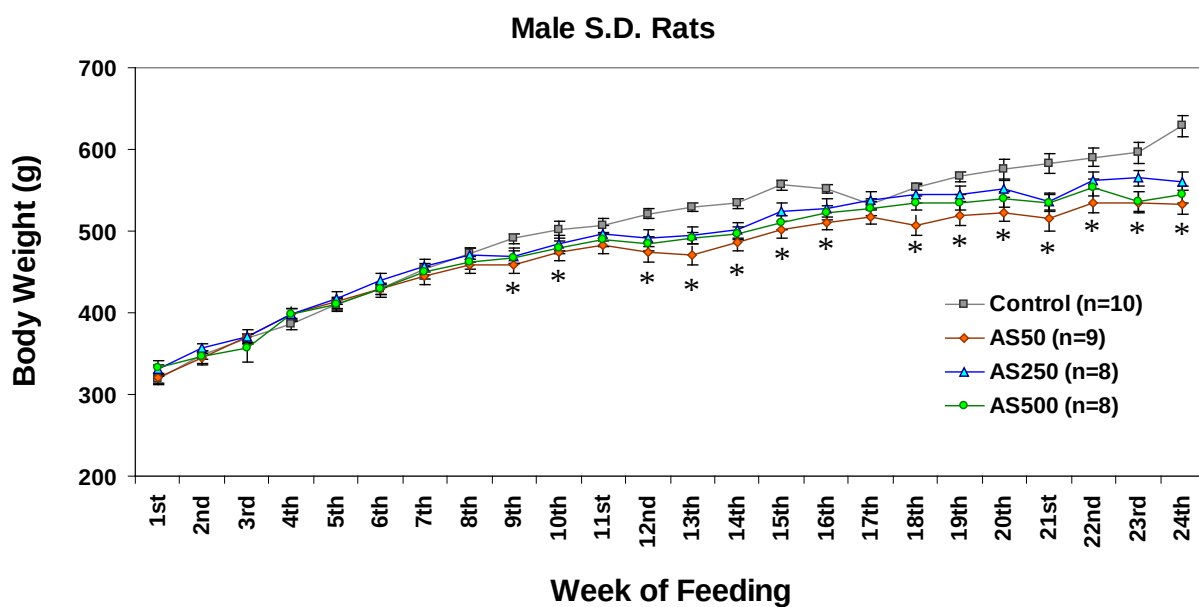
ตารางที่ 16 อัตราการตายของหนูในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบตลอดการทดลองนาน 24 สัปดาห์

Animal group	Fatality ratio [#] (n/N)		Total (n/N)
	Male	Female	
Vehicle (Control)	0/10	0/10	0/20
AS50 mg/kg	0/10	0/9	0/19
AS250/100 mg/kg	0/9	0/10	0/19
AS500 mg/kg	0/9	0/9	0/18

Note: [#] the number of animal(s) died during the experiment (n) /the total number of animals in each group (N)



รูปที่ 21 ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของหนูทดลองเพศเมีย กราฟแต่ละเส้นแสดงค่าเฉลี่ย ($\pm$ s.e.m.) ของน้ำหนักตัว (* = $P < 0.05$; unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 22 ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของหนูทดลองเพศผู้ กราฟแต่ละเส้นแสดงค่าเฉลี่ย ($\pm$ s.e.m.) ของน้ำหนักตัว (* = $P < 0.05$; unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

2.2 ผลต่ออวัยวะภายใน

เมื่อครบป้อนสารครบ 6 เดือนแล้ว หนูทดลองทุกตัวในแต่ละกลุ่ม ถูกนำไปชั่งน้ำหนักตัว จากนั้นได้ถูกทำให้ตายอย่างสงบ โดยการฉีด urethane 3 ก./กก. น้ำหนักตัว เพียงครั้งเดียว และทำการผ่าตัดแยกอวัยวะส่วนต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น และอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูทดลองเพศเมีย ได้แก่ มดลูก และรังไข่ สำหรับอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูทดลองเพศผู้ได้เก็บต่อมลูกหมาก และอัณฑะ นำอวัยวะเหล่านี้มาชั่งน้ำหนักเพื่อการคำนวณกับ 100 ก. น้ำหนักตัวและบันทึกผลเป็นค่า tissue wet weight (g) โดย ในตารางที่ 17 และ 18 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะของหนูทดลองเทียบน้ำหนักตัวขณะถูกทำให้ตายอย่างสงบ (สัปดาห์ที่ 14) โดยทำการเปรียบเทียบในแต่ละตัวจากนั้นจึงนำมาเฉลี่ย ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวทำละลาย (Vehicle control) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 50, 250 และ 500 มก. /กก. น้ำหนักตัวหนูทดลอง ทั้งในหนูของหนูเพศเมียและเพศผู้ ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักแต่ละอวัยวะหนูทดลองกลุ่มทดสอบทั้ง 3 กลุ่ม ทั้งในหนูเพศเมีย (ตารางที่ 17) และเพศผู้ (ตารางที่ 18) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$; repeated measures one-way ANOVA)

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศเมียกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

Female Rats	Vehicle Control		AS50		AS250		AS500	
	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM
Body Weight (g)	339.0	± 5.8	332.9	± 5.7	341.8	± 12.5	317.6	± 7.9
Tissue Wet Weight (g/b.w.)								
Brain	2.0	± 0.1	2.0	± 0.04	1.9	± 0.1	1.9	± 0.05
Heart	1.4	± 0.3	1.3	± 0.2	1.4	± 0.1	1.5	± 0.2
Lungs	1.9	± 0.2	1.8	± 0.2	1.7	± 0.3	1.9	± 0.3
Liver	7.6	± 1.0	7.1	± 0.5	7.1	± 0.7	7.5	± 0.6
Spleen	0.8	± 0.1	0.7	± 0.1	0.7	± 0.1	0.8	± 0.4
Kidneys	2.1	± 0.2	2.1	± 0.1	2.0	± 0.2	2.1	± 0.2
Stomach & Deodenum	4.1	± 0.5	4.0	± 0.2	3.7	± 0.3	3.9	± 0.3
Ovaries & Uterus	1.8	± 0.4	1.3	± 0.2	1.1	± 0.1	1.3	± 0.2

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบ
กฤษณาในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

Male Rats	Control		AS 50		AS 250		AS 500	
	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM	mean	SEM
Body Weight (g)	628.87	± 12.63	532.77	± 12.36	561.11	± 11.53	544.78	± 10.87
Tissue Wet Weight (g/100 g b.w.)								
Brain	2.09	± 0.02	2.15	± 0.30	2.19	± 0.04	2.11	± 0.02
Heart	2.06	± 0.06	1.70	± 0.60	1.92	± 0.06	1.86	± 0.09
Lungs	2.22	± 0.05	2.43	± 0.12	2.27	± 0.08	2.57	± 0.13
Liver	13.86	± 0.55	14.13	± 0.84	14.11	± 0.47	13.40	± 0.51
Spleen	1.34	± 0.03	1.01	± 0.04	1.15	± 0.04	1.18	± 0.05
Kidneys	4.07	± 0.08	3.47	± 0.15	3.72	± 0.10	3.51	± 0.06
Stomach & Deodenum	3.53	± 0.20	4.56	± 0.43	4.64	± 0.39	4.38	± 0.40
Testis	4.48	± 0.10	4.00	± 0.27	4.19	± 0.13	4.22	± 0.13
Seminal vesicle	2.69	± 0.14	3.95	± 0.14	4.66	± 0.22	3.82	± 0.10

2.3 ผลของสารสกัดใบกฤษณาต่อจำนวนเม็ดเลือดและค่าทางชีวเคมีในเลือด

ค่าทางชีวเคมีของเลือดที่ได้จากหนูทดลองทั้งสองเพศ ทั้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (Control) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) ขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัวหนูทดลอง เป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งภายหลังจากครบกำหนดหนูทุกตัวได้ถูกทำให้ตายอย่างสงบ (สัปดาห์ที่ 24) และเก็บตัวอย่างเลือดมาตรวจวิเคราะห์เพื่อนับจำนวนเม็ดเลือด (complete blood count, CBC) ได้แก่ (white blood cell, WBC), จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell, RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean platelet volume (MPV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT), red blood cell distribution width (RDW-SD), platelet distributed width (PDW), plateletcrit-large cell ratio (P-LCR), average platelet hematocrit (PCT), neutrophil (NEUT), lymphocytes (LYMPH), monocytes (MONO), eosinophyl (EO) และ basophil (BASO) เป็นต้น ดังแสดงตารางที่ 11 ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า เฉพาะหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 มก./กก. เท่านั้นที่พบเฉพาะ HCT มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* = $P < 0.05$; repeated measures one-way ANOVA and Dunnett's pos hoc test) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าพิสัยปกติ (normal range of HCT = 41 - 53%) แปลผลได้ว่าสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงในหนูกลุ่มนี้มีค่าสูงกว่าปกติเพียงเล็กน้อย (Tumkiratiwong, 2004)

สำหรับผล complete blood count ในหนูเพศผู้ (ตารางที่ 19) พบว่ามีค่า RBC, HGB, HCT และ PLT ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีค่า MCV และ RDW-SD ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; repeated measures one-way ANOVA and Dunnett's test) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าพิสัยปกติ ของหนูเพศเดียวกันแล้ว (normal range of MCV = 54.3-58.0) ถือว่าต่ำกว่าเกณฑ์ปกติเพียงเล็กน้อย (Tumkiratiwong, 2004)

ผลวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีในเลือดแสดงในตารางที่ 20 ซึ่งได้แก่ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, Bilirubin To, Bilirubin DI, aspartate transaminase (AST) หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine transaminase (ALT) หรือ serum glutamic pyruvate transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP) และ globulin เป็นต้น พบว่า เฉพาะหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับ สารสกัดขนาด 50 และ 500 มก./กก. เท่านั้น ที่มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($* = P < 0.05$; repeated measures one-way ANOVA and Dunnett's pos hoc test) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าพิสัยปกติ (normal range of BUN= 15-21 mg/dL) แล้วถือว่าต่ำกว่าเกณฑ์ปกติเพียงเล็กน้อย (Johnson-Delaney, 1996)

ตารางที่ 19 ข้อมูลทางชีวเคมีของเลือดของหนูเพศเมียและเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

Female Rats		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW-SD	RDW-CV	PDW	MPV	P-LCR	PCT	NEUT	LYMPH
Control (n = 9)	Mean	3.0	9.9	18.0	55.9	56.6	18.2	32.2	778.1	31.7	18.9	7.5	6.9	5.5	0.5	0.8	2.0
	S.D.	1.5	0.6	1.0	2.6	1.9	0.5	0.6	154.3	3.4	0.8	0.2	0.1	0.8	0.1	0.3	1.1
AS50 (n = 5)	Mean	2.3	10.0	18.1	55.3	55.5	18.1	32.7	811.0	29.8	18.5	7.5	6.9	5.4	0.6	0.5	1.7
	S.D.	1.1	0.4	0.6	1.6	0.7	0.3	0.6	77.7	1.2	0.8	0.2	0.1	0.6	0.1	0.2	1.0
AS250 (n = 3)	Mean	2.5	9.9	17.7	52.9*	53.7	18.0	33.4	779.3	29.1	18.4	7.5	7.0	5.8	0.5	1.0	1.4
	S.D.	0.2	0.4	0.5	0.7	1.8	0.4	0.6	158.8	0.7	1.5	0.3	0.3	2.0	0.1	0.3	0.1
AS500 (n = 5)	Mean	2.9	9.8	17.9	53.9	55.2	18.3	33.2	782.2	29.1	18.5	7.6	7.0	5.9	0.5	1.2	1.7
	S.D.	1.0	0.5	0.7	2.2	1.4	0.2	0.6	117.3	1.9	0.8	0.2	0.1	0.5	0.1	0.6	0.5

Male Rats		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW-SD	RDW-CV	PDW	MPV	P-LCR	PCT	NEUT	LYMPH
Control (n = 9)	Mean	2.6	8.4	14.9	47.1	56.1	17.7	31.6	657.4	34.7	20.4	8.0	7.2	6.0	0.5	0.38	2.2
	S.D.	1.0	1.7	2.9	9.2	1.3	0.3	0.4	134.3	1.2	1.4	1.0	0.6	4.2	0.1	0.16	0.9
AS50 (n = 8)	Mean	4.0	10.3*	17.7*	55.0*	53.5*	17.2	32.2	981.3*	32.2*	20.2	7.8	7.1	6.2	0.7	0.7	3.1
	S.D.	1.4	0.6	0.9	2.4	1.3	0.3	0.4	100.5	1.3	0.8	0.1	0.1	0.5	0.1	0.21	1.2
AS250 (n = 7)	Mean	3.7	10.3*	17.8*	55.4*	53.9*	17.3	32.1	957.1*	31.8*	19.9	7.4	6.9	5.3	0.7	0.8	2.7
	S.D.	0.8	0.6	0.9	2.5	1.4	0.2	0.5	83.6	1.2	0.7	0.3	0.2	1.0	0.1	0.49	0.8
AS500 (n = 7)	Mean	3.5	9.1	15.7	47.5	52.6*	17.2	32.7	898.0*	29.0*	18.6*	7.2	6.9	4.9	0.6	0.5	2.7
	S.D.	0.7	0.1	0.2	1.0	1.1	0.3	0.3	121.1	0.7	0.5	0.3	0.2	1.0	0.1	0.04	0.6

(* = P < 0.05; repeated measures one-way ANOVA and Dunnett's pos hoc test)

ตารางที่ 20 ข้อมูลทางชีวเคมีของเลือดของหนูเพศเมียและเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

Female Rats		BUN	Creatinine	Total protien	Albumin	Bilirubin To	Bilirubin DI	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	Globulin
Control (n = 9)	Mean	26.0	0.9	6.0	3.7	0.1	0.1	317.2	69.3	25.0	2.3
	S.D.	4.1	0.1	0.4	0.2	0.0	0.0	154.4	26.3	5.5	0.2
AS50 (n = 5)	Mean	29.6	1.0	5.6	3.5	0.1	0.1	310.6	65.0	28.4	2.1
	S.D.	4.5	0.2	0.5	0.3	0.0	0.0	73.6	18.6	5.3	0.2
AS250 (n = 3)	Mean	29.8	0.8	5.6	3.5	0.1	0.1	420.3	80.5	27.5	2.1
	S.D.	5.7	0.2	0.4	0.2	0.0	0.0	189.0	36.1	3.3	0.1
AS500 (n = 5)	Mean	28.8	0.7	5.9	3.7	0.1	0.1	338.4	69.8	26.0	2.2
	S.D.	7.1	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0	123.6	18.5	4.7	0.2

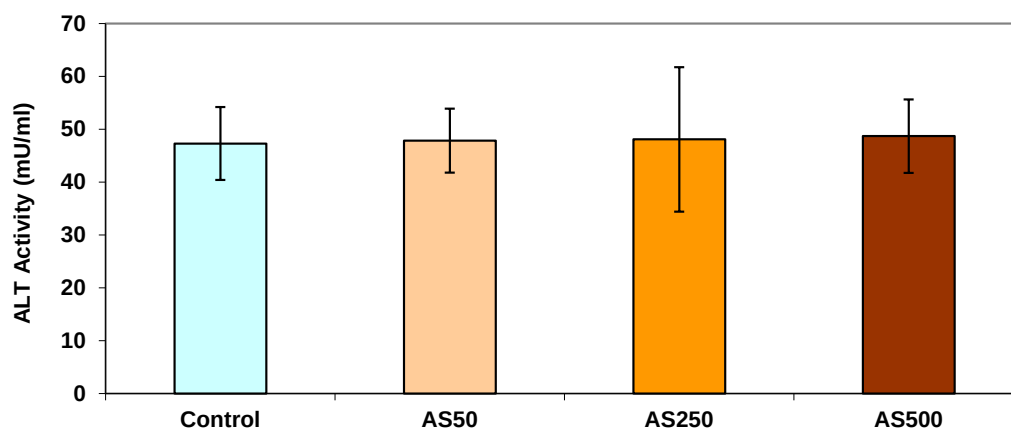
Male Rats		BUN	Creatinine	Total protien	Albumin	Bilirubin To	Bilirubin DI	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	Globulin
Control (n = 9)	Mean	28.1	0.5	6.4	3.9	0.1	0.1	153.4	37.4	79.4	2.4
	S.D.	4.5	0.1	0.6	0.3	0.0	0.0	21.9	9.7	28.5	0.3
AS50 (n = 8)	Mean	19.8*	0.7	5.9	3.3	0.1	0.1	203.4	73.9	44.8	2.5
	S.D.	1.8	0.1	0.3	0.3	0.0	0.0	69.0	33.9	3.9	0.2
AS250 (n = 7)	Mean	25.0	0.8	5.8	3.2	0.1	0.1	261.6	113.6	42.1	2.5
	S.D.	4.0	0.2	0.4	0.2	0.0	0.1	88.3	46.7	3.7	0.3
AS500 (n = 7)	Mean	20.7*	0.4	5.9	3.2	0.1	0.1	115.1	40.7	43.3	2.6
	S.D.	2.0	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	20.3	9.6	5.8	0.2

(* = $P < 0.05$; repeated measures one-way ANOVA and Dunnett's pos hoc test)

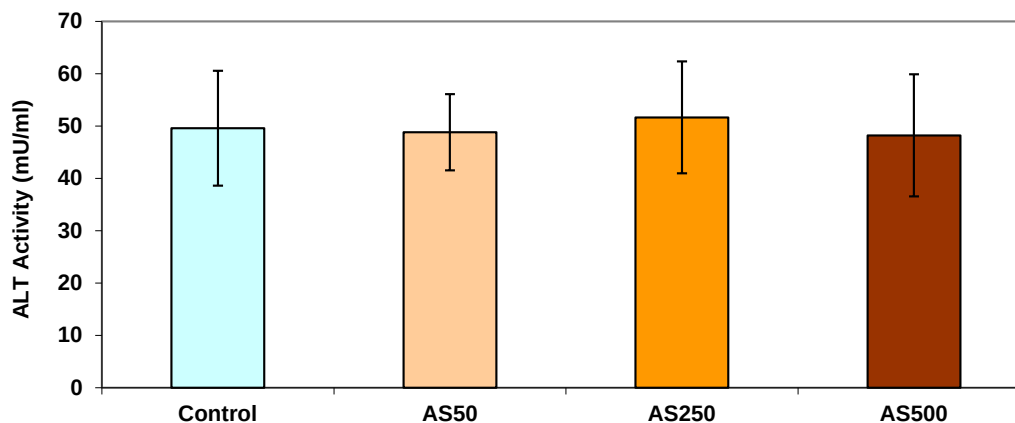
2.4 ผลของสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์ในตับ

จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine transaminase (ALT) จากตับที่แยกจากหนูกลุ่มควบคุม (Control) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา (AS) ในแต่ละขนาด ทั้งหนูเพศเมียและเพศผู้แสดงในรูปที่ 23 ซึ่งผลการทดสอบด้วย ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$; ANOVA)

Aspartate Aminotransferase Activity from Female Rats



Alanine Transaminase Activity from Male Rats

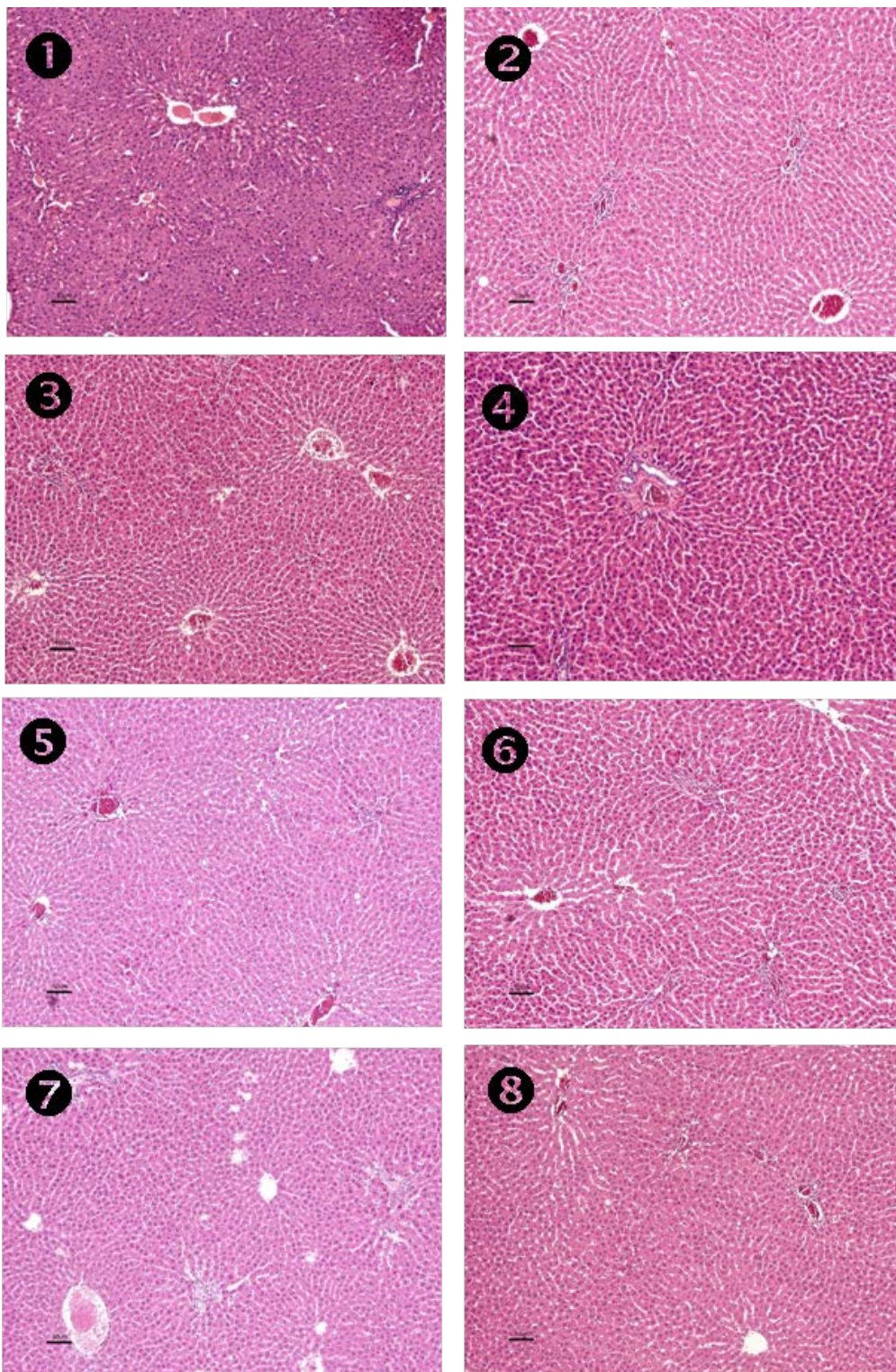


รูปที่ 23 ผลของสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine transaminase (ALT) ในตับของหนูกลุ่มต่างๆ

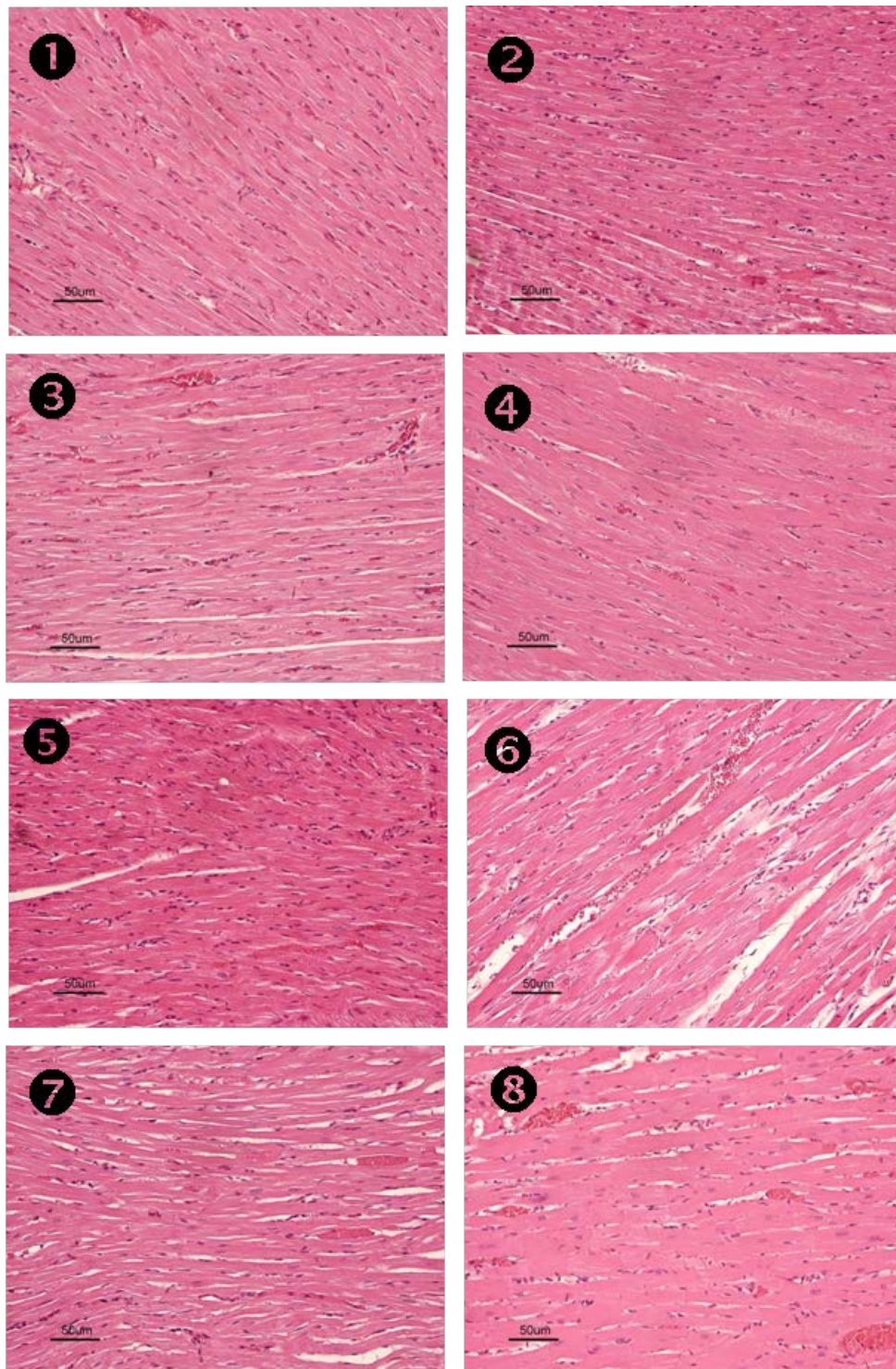
2.5 ผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของอวัยวะภายใน

จากการสังเกตลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะภายในที่สำคัญ ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด ตับอ่อน รังไข่ (เพศเมีย) มดลูก (เพศเมีย) ต่อมลูกหมาก (เพศผู้) อัณฑะ (เพศผู้) ม้าม กระเพาะ และลำไส้เล็ก ของหนูที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา ผู้วิจัยไม่พบว่ามีความผิดปกติที่เห็นเด่นชัด และหลังจากทำการ fix เนื้อเยื่อ, ฝานด้วยเครื่องไมโครโทม และย้อมสไลด์แผ่นฝานเนื้อเยื่อ เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัลเพื่อเก็บบันทึกตัวอย่างของการจัดเรียงตัวของเซลล์ ในแผ่นฝานของอวัยวะภายใน ซึ่งผลการพิจารณาลักษณะและการเรียงตัวของเซลล์ในแต่ละเนื้อเยื่อทั้งหมด กลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาดต่างๆ ผู้วิจัยไม่พบความผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายขนาด x50 และ x100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 24--32

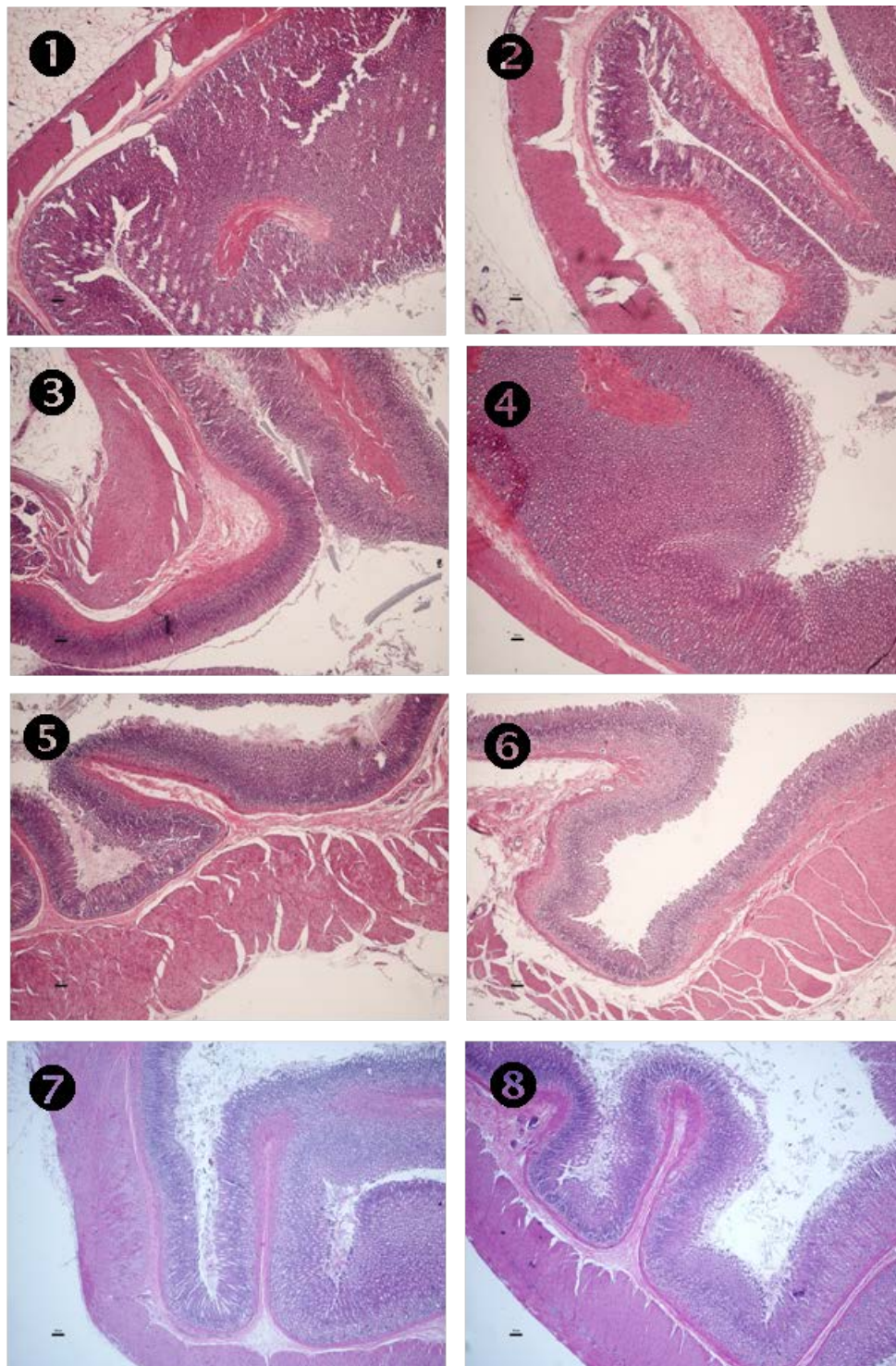
รูปที่ 24 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



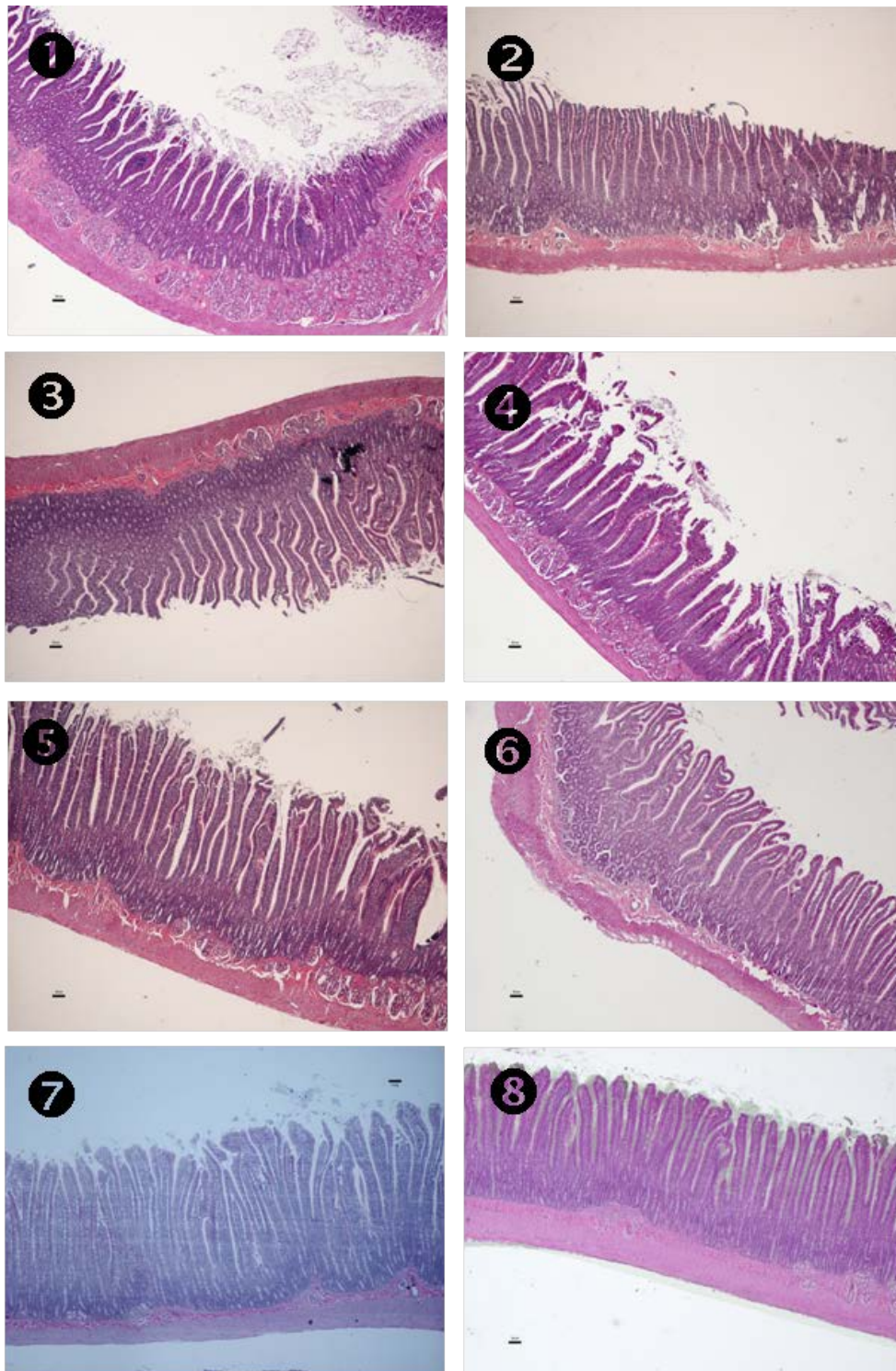
รูปที่ 25 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อหัวใจในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



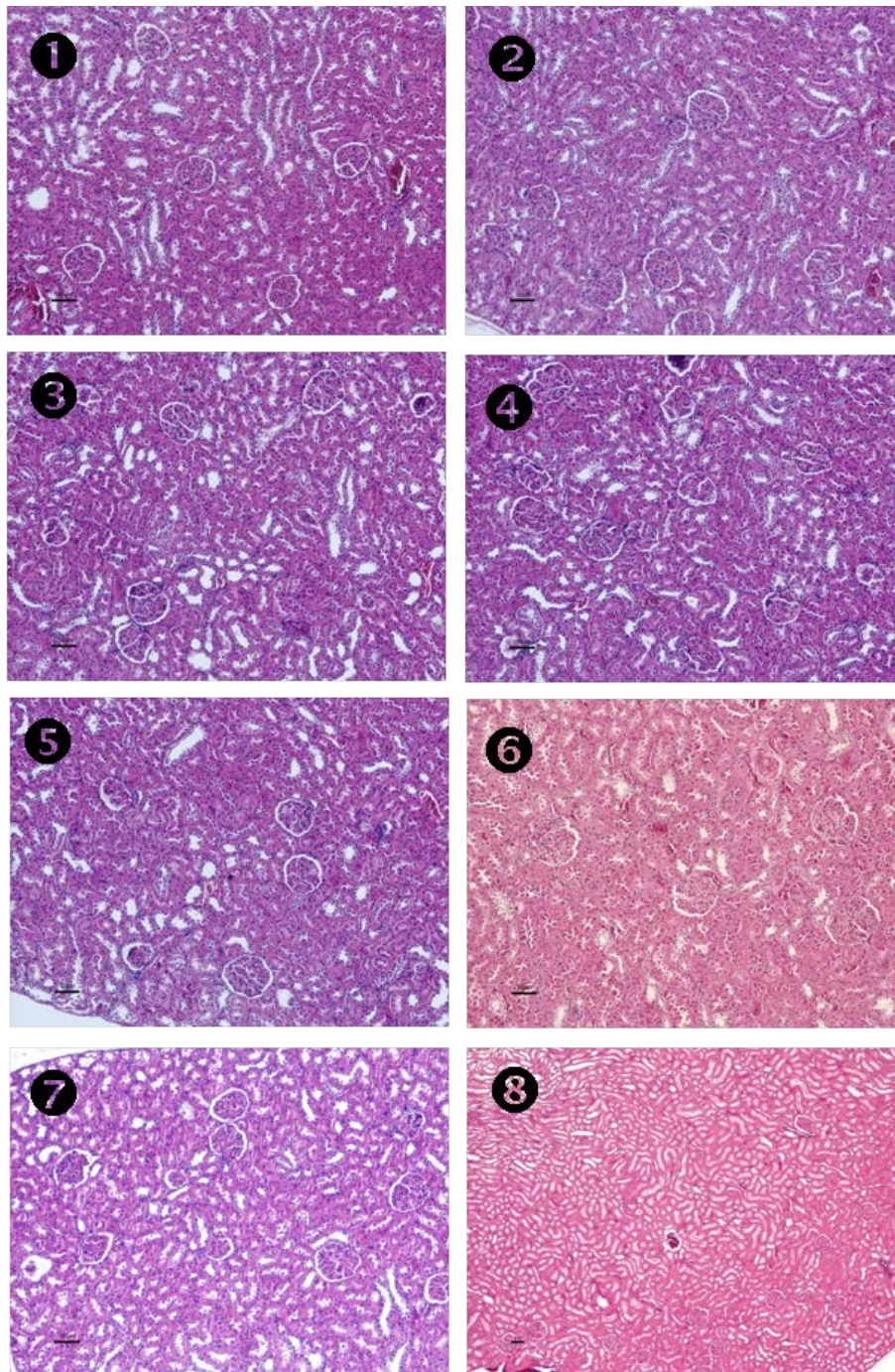
รูปที่ 26 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของกระเพาะอาหารในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



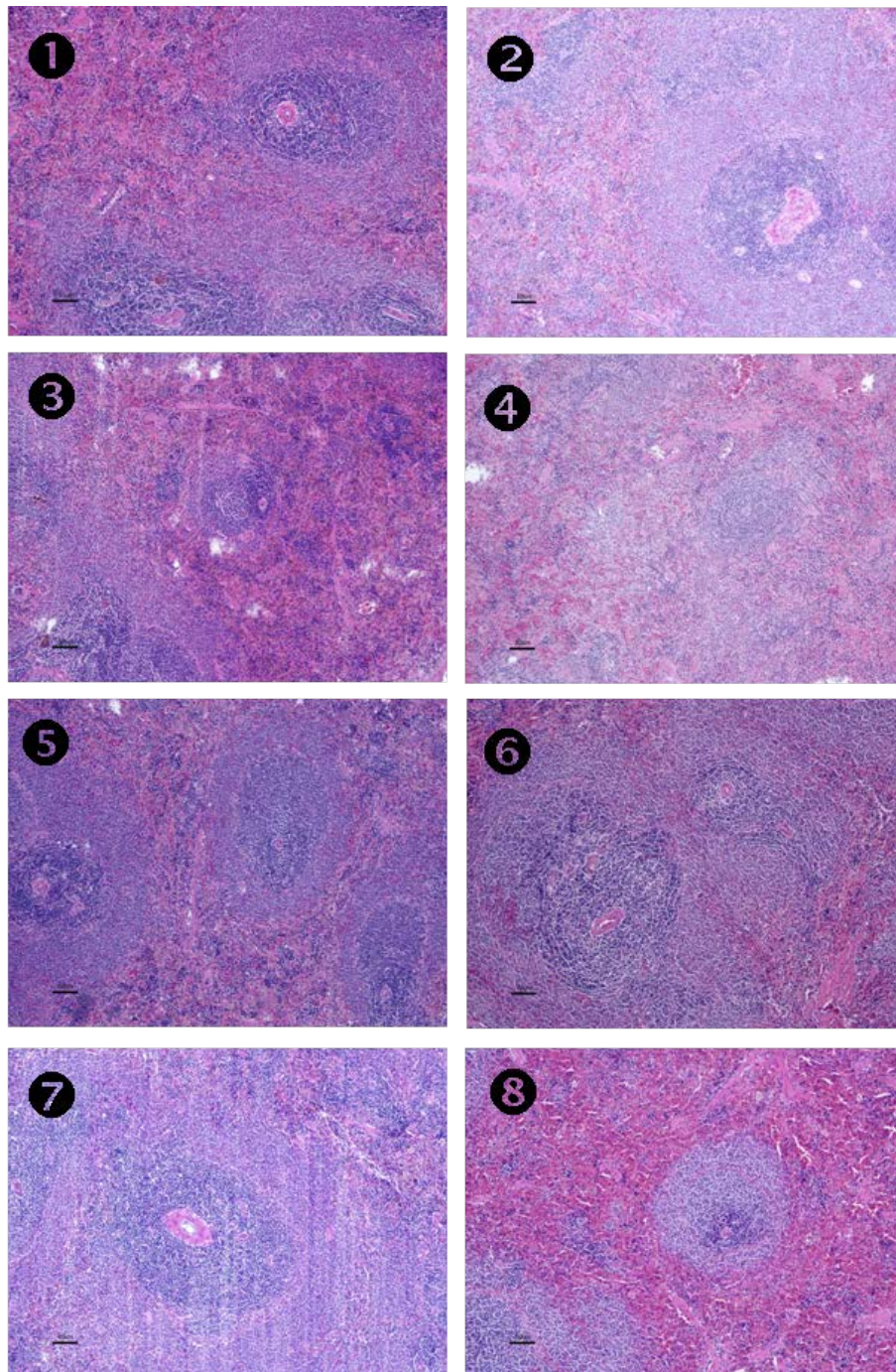
รูปที่ 27 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้เล็กส่วนต้นในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



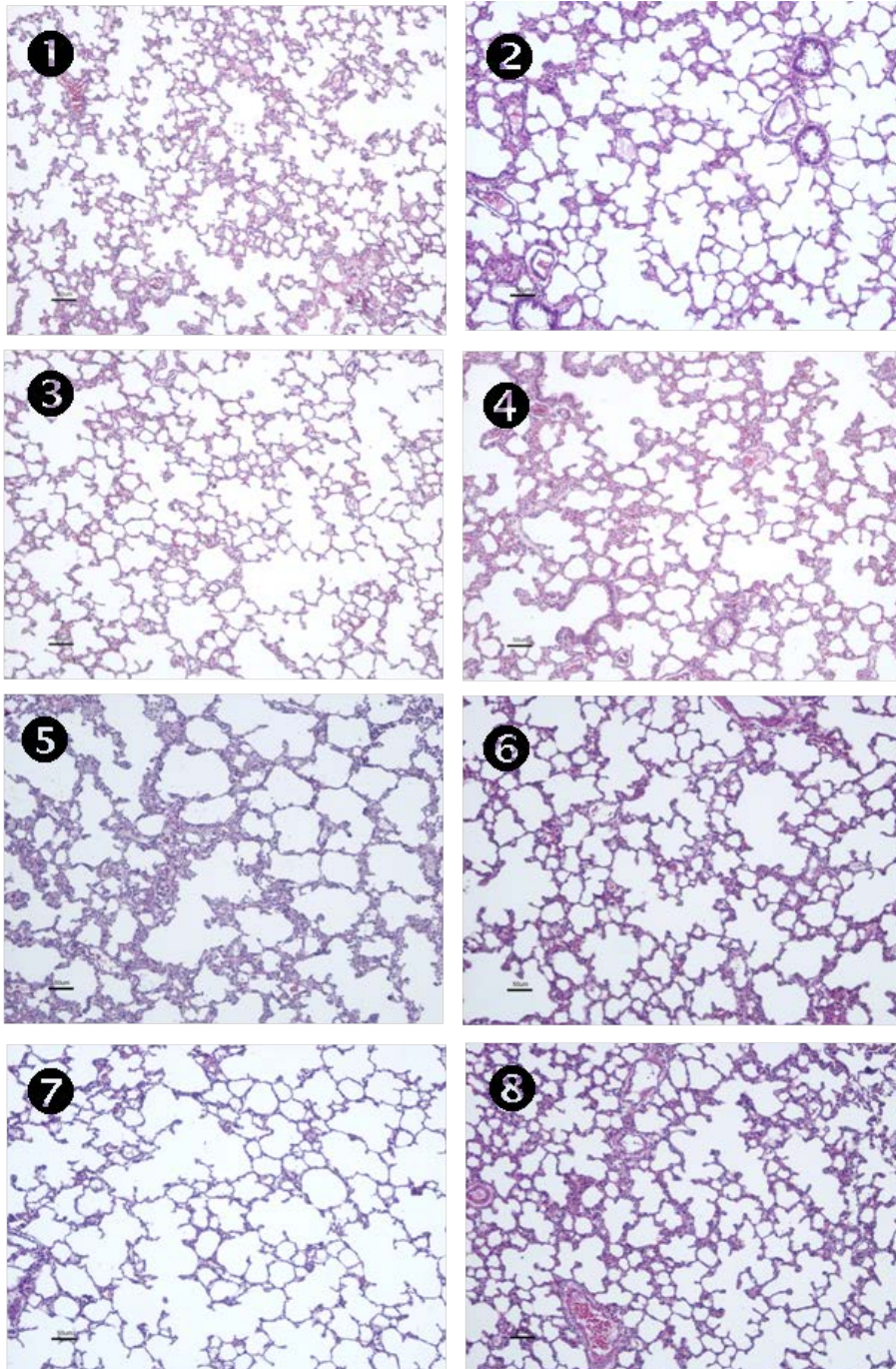
รูปที่ 28 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของไตในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



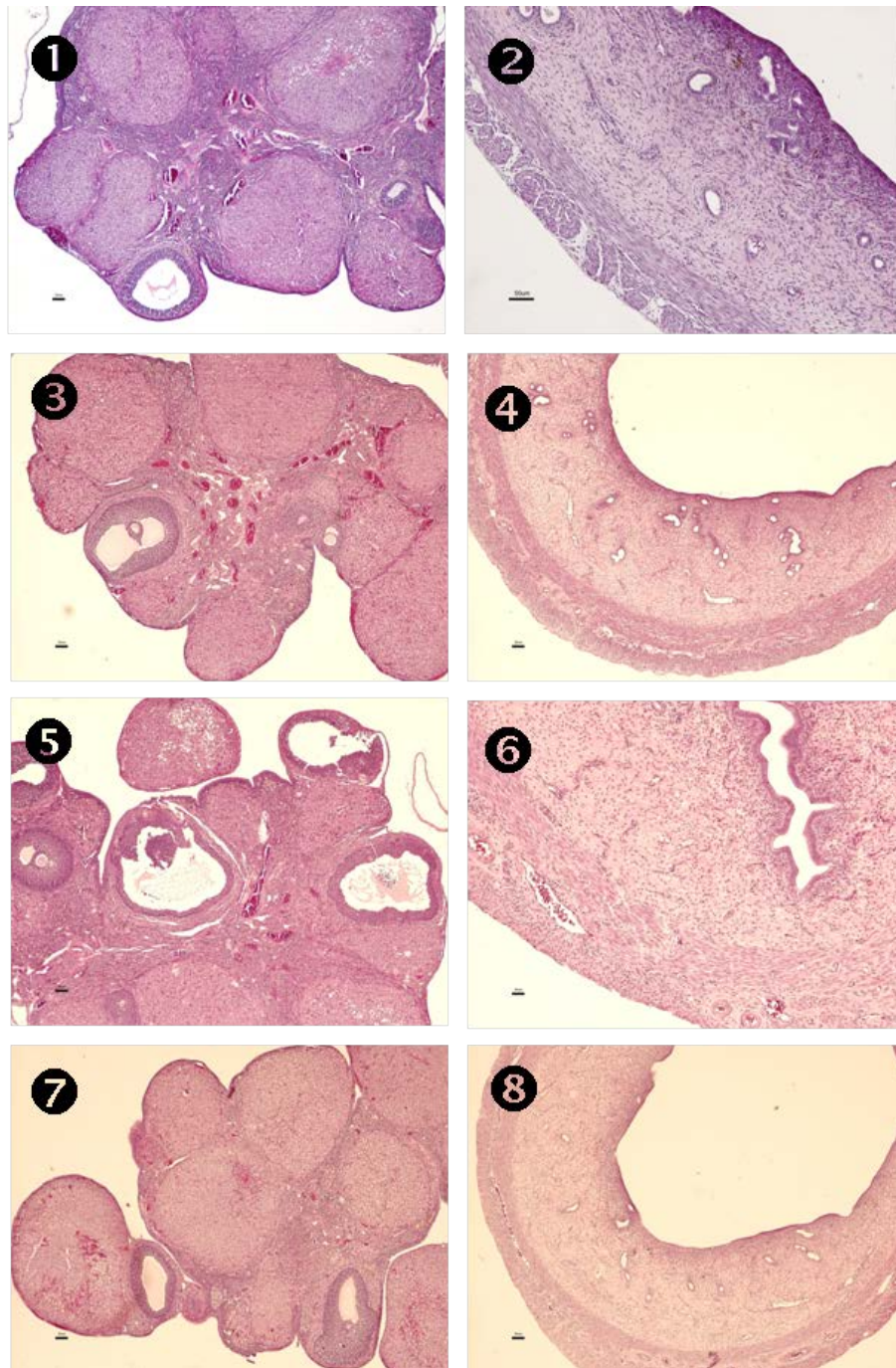
รูปที่ 29 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของม้ามในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



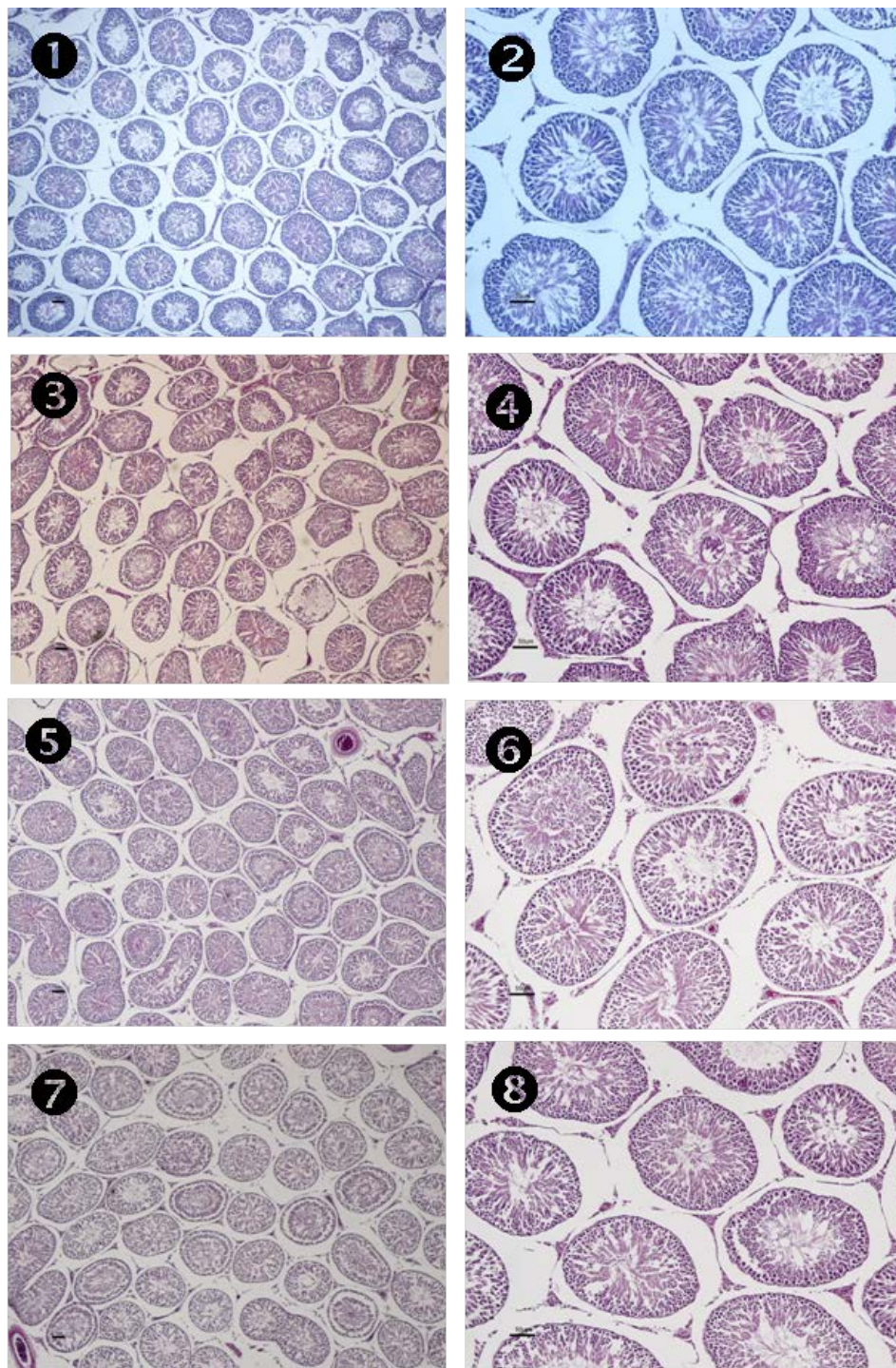
รูปที่ 30 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของปอดในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของหนูเพศผู้ที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) เปรียบเทียบกับหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8)



รูปที่ 31 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของรังไข่ของหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (1), AS50 (3), AS250 (5) และ AS500 (7) และผนังมดลูกของหนูเพศเมียที่ได้รับตัวทำละลาย (2), AS50 (4), AS250 (6) และ AS500 (8) ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง



รูปที่ 32 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะของหนูเพศผู้ (กำลังขยาย 4x [ซ้าย] 10x [ขวา]) ที่ได้รับตัวทำละลาย (1, 2), AS50 (3, 4), AS250 (5, 6) และ AS500 (7, 8) ในการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสกัดน้ำของใบกฤษณา โดยใช้ยอดใบอ่อนในส่วนของพืช ตามรูปแบบการใช้ของพระธรรมเสนานูวัตร รองเจ้าคณะภาค 5 เจ้าอาวาสวัดพระศรีรัตนมหาธาตุวรมหาวิหาร จังหวัดพิษณุโลก โดยทำให้สารสกัดแห้งด้วยวิธี freeze-dry ซึ่งจะให้ % สารสกัดสูงกว่า spray-dry สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี โดยสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในสารสกัดคือ mangiferin ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 13.88 ± 0.03 % นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ปริมาณ total polyphenol ในผงใบกฤษณาโดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu มีพบว่าใบกฤษณาที่มีปริมาณ total polyphenol สูงเทียบเท่ากับชาเขียว จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่ถูกทำแห้งโดยวิธี freeze dry และ spray dry ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดชาเขียวประมาณ 3-5 เท่า ในขณะที่สาร mangiferin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

การวิจัยครั้งนี้ ได้ค้นพบศักยภาพของใบกฤษณาในด้านการนำมาใช้ต้านอนุมูลอิสระเป็นครั้งแรก โดยมีสารประกอบหลักคือ mangiferin การที่ mangiferin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงนี้ ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพ (marker) ของใบกฤษณา ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณา เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณาในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณาซึ่งยังไม่เคยมีรายงานวิจัยที่ระบุถึงความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณาต่อพฤติกรรมและร่างกาย รายงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ได้ทดสอบทางพิษวิทยาโดยกระทำในหนูทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันตามหลักเกณฑ์ของ OECD (1998, 2001) เมื่อป้อนสารตัวทำละลาย (น้ำ) และสารสกัดใบกฤษณาขนาด 2 ก./กก. ทางปากและให้เพียงครั้งเดียว พบว่าสารสกัดในขนาดที่สูงมากนี้ไม่ทำให้หนูทดลองตายระหว่างการศึกษา มีอาการเพิ่มการขับถ่ายและอุจจาระเหลว ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนูทดลอง และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ผิดปกติของเซลล์ในอวัยวะภายใน (เช่น ตับ หัวใจ ปอด ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ม้าม มดลูก รังไข่ และอวัยวะ เป็นต้น) สำหรับผลเพิ่มการขับถ่าย (laxative effect) นั้นตรงกับสรรพคุณของสมุนไพรร และรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อป้อนสารสกัดกฤษณาให้แก่หนูทดลองในขนาด 300 และ 600 มก./กก. นน.ตัว/วัน ติดต่อกันนาน 14 วัน สามารถกระตุ้นการขับถ่ายได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Hara et al, 2008; Kakino et al., 2010)

ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารตัวละลายและสารสกัดใบกฤษณาด้วยขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก. วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 6 เดือน พบว่า ไม่ทำให้หนูทดลองตายระหว่างการการศึกษา และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติใดๆ ต่อจำนวนเม็ดเลือดชนิดต่างๆ รวมทั้งค่าชีวเคมีของ

เลือด นอกจากนี้ผลการบริโภคติดต่อกันอย่างยาวนานนี้ยังไม่ส่งผลทำให้เซลล์ในอวัยวะภายในเกิดความผิดปกติแต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบกฤษณาที่มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง

สิ่งที่น่าสนใจสำหรับหนูที่ได้รับการป้อนสารสกัดใบกฤษณาอย่างยาวนานคือ ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 500 มก./กก./วัน แสดงผลการลดน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แต่สำหรับหนูเพศผู้ เมื่อได้รับสารสกัดใบกฤษณาในขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มในอัตราที่น้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยไม่ได้ออกแบบสำหรับการเก็บอุจจาระในแต่ละวัน แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าผลการลดน้ำหนักตัวอาจเกิดจาก laxative effect ของสารสกัดใบกฤษณาดังที่ Hara และคณะได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Hara et al, 2008; Kakino et al., 2010)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นความปลอดภัยเมื่อใช้สารสกัดใบกฤษณาทดสอบในหนูทดลองทั้งสองเพศในขนาดสูงถึง 2000 มก./กก. เพียงครั้งเดียว หรือขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันนาน 6 เดือน ซึ่งการศึกษาในขั้นตอนต่อไปน่าจะทำการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารและน้ำ รวมทั้งเก็บข้อมูลการขับถ่าย (อุจจาระและปัสสาวะ) โดยแยกการศึกษาสำหรับหนูทดลองแต่ละตัวในกรงเลี้ยงแบบ metabolic chamber เพื่อตรวจสอบฤทธิ์กระตุ้นการขับถ่ายและยืนยันว่าสารสกัดนี้สามารถช่วยลดน้ำหนักได้หรือไม่อย่างไร ข้อมูลนี้จะเป็นสิ่งสำคัญในการยืนยันสรรพคุณของใบชากฤษณา และสามารถพัฒนาให้เป็นอาหารเสริมหรือยาเพื่อบำรุงระบบทางเดินอาหาร และใช้รับประทานเพื่อการลดน้ำหนักตัว โดยที่มีความปลอดภัยสูง ซึ่งอาหารเสริมชนิดนี้กำลังเป็นที่ต้องการมากในกลุ่มคนที่กำลังเป็นโรคอ้วน

ในการวิจัยขั้นต่อไป น่าที่จะมีการศึกษาผลทางเภสัชวิทยาของใบกฤษณาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เช่น ฤทธิ์ด้านอักเสบ ฤทธิ์ป้องกันประสาทเสื่อม (neuroprotective) antiaging เป็นต้น เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากใบกฤษณาในทางการแพทย์และเครื่องสำอาง รวมทั้งการพัฒนาารูปแบบผลิตภัณฑ์ และการคำนวณค่าความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- คณะ 5 อาจารย์ เกษษกรไทยและเพื่อน (พ.ศ. 2523) ตำราเภสัชกรรมไทยแผนโบราณ. ห้าง 5 เกษษกรขายยาไทย. กรุงเทพมหานคร.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (พ.ศ. 2537) กฤษณา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- เสรี อาจสาธิต (พ.ศ. 2534) การใช้สมุนไพร. หัวข้อที่ 142. กฤษณา. หน้า 129 ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์พิทยาคาร. กรุงเทพฯ.
- เสริมสกุล พจนการุณ. ข้อมูลวิชาการ เรื่อง กฤษณา. กลุ่มงานคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข. 1 มิ.ย. 2551.
- องอาจ คล้ามไพบูลย์ (พ.ศ. 2545) กฤษณา ไม้หอม ไม้มหาศรัย. สำนักพิมพ์สนธิใจ, กรุงเทพฯ.
- Bock,C.,Waldmann,KH.,Ternes,W.(2008). Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutrition Research*.28,879-891.
- Feng, J. Yang, X., Wang R. (2011) Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, 72: 242-247
- Hara H, Ise Y, Morimoto N, Shimazawa M, Ichihashi K, Ohyama M, Iinuma M (2008) Laxative effect of agarwood leaves and its mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:335-345.
- Johnson-Delaney C (1996). Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians (2 Vol. Set). Lake Worth, FL: Zoological Education Network.
- Kakino M, et al. (2010) Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10: 2-8.
- Minyar PB, Chitre TS, Deuskar HJ, Karve SS, Jain KS (2008) Antioxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methaemoglobin formation. *International Journal of Green Pharmacy*: 116-117.
- Nuengchamnong, N. & Ingkaninan, K.(2009). On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 297-302.
- Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato A (1993) Effects of agarwood extracts on the central nervous system in mice. *Planta Med* 59:32-36.

- Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato A (1996) Effect of jinkoh-eremol and agarospirol from agarwood on the central nervous system in mice. *Planta Med* 62:2-6.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Guideline 408, Repeated Dose 90 day Toxicity Study in Rodents, 1998)
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, Guideline 420, Acute oral toxicity-Fixed Dose Procedure, 2001)
- Qi,J.,Lu,JJ.,Liu,JH.,Yu,BY.(2007).Flavonoid and a rare benzophenone glycoside from the leaves of *Aquilaria Sinensis*. *Chem Pharm Bull*, 57(2),134-137.
- Takemoto H, Ito M, Shiraki T, Yagura T, Honda G (2008) Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *Nat Med (Tokyo)* 62:41-46.
- Tanaka J, Uchimura N, Hashizume Y, Shirakawa S, Satomura T, Ohyama T, Takeuchi N, Kuwahara H, Maeda H (2002) Effects of aroma on sleep and biological rhythms. *Psychiatry Clin Neurosci* 56:299-300.
- Thomas PK, Jefferys JG, Sharma AK, Bajada S (1981) Nerve conduction velocity in experimental diabetes in the rat and rabbit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44: 233-238.
- Tumkiratiwong P (2004) The Synergistic Effects of Riboflavin Deficiency and *Trichinella spiralis* Infection in Wistar rat Model. Ph.D. thesis, Mahidol University.
- Warrier PK, Nambiar VPK, Ramankutty C and Nair RV. (1996) *Indian Medicinal Plants: a compendium of 500 species*. 2nd edit., Orient Longman Pvt. Ltd., Chennai, India, pp: 171-172.
- Wisuttirot, W., Somsiri, A., Ingkaninan, K., Waranuch, N. (2011) A novel technique for chitosan microparticle preparation using a water/silicone emulsion: green tea model. *Int J Cosmet Sci*. 1-8.
- Zhou M, Wang H, Suolangjiba, Kou J, Yu B (2008) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. *J Ethnopharmacol* 117: 345-350.

ภาคผนวก



เอกสารรับรองโครงการ
คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ	การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในสัตว์ทดลอง Screening of the toxicity of agarwood leaf extract in experimental animals.
เลขที่โครงการ	NU-AE530602
เลขที่เอกสารรับรอง	53 04 0019
ประเภทการรับรอง	เต็มรูปแบบ
ชื่อหัวหน้าโครงการ/ผู้ยื่นขอฯ	ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์
สังกัดหน่วยงาน /คณะ	วิทยาศาสตร์การแพทย์
วันที่รับรอง	วันที่ 21 ตุลาคม 2553

ขอรับรองว่าโครงการวิจัยนี้ ได้รับการรับรองด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์
จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชกิจ ยะโสธรศรีกุล)

วันที่ ๗ เดือน ๓ พ.ศ. ๕๖

ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ

ดร.เนติ วรรณุช

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3 2097 00117 12 2

ตำแหน่ง

รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-968606

โทรสาร 055-968606

E-mail Address

: netiw@nu.ac.th และ netiw@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และ ประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชาเอก	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ.2541	ประกาศนียบัตรหลังปริญญาเอก	Postdoctoral Training	Pharmaceutics		University of Michigan	สหรัฐอเมริกา
พ.ศ.2540	ปริญญาเอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	Pharmaceutics		University of Michigan	สหรัฐอเมริกา
พ.ศ.2538	ปริญญาโท	M.S. in Pharmaceutical Sciences	Pharmaceutics		University of Michigan	สหรัฐอเมริกา
พ.ศ.2531	ปริญญาตรี	ภ.บ.(เภสัชดินิยม) เภสัชศาสตรบัณฑิต	-	-	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

ประสบการณ์การทำงาน - การสอน

2553 – 2554

ที่ปรึกษาด้านพัฒนาผลิตภัณฑ์ ของ บจ.อำพันยูธ อินเทอร์เน็ต

กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

- 2553 – 2554 ที่ปรึกษาด้านพัฒนาผลิตภัณฑ์ ของ บริษัท เขาค้อทะเลภู จำกัด จังหวัดเพชรบูรณ์ ประเทศไทย
- 2552 คณะกรรมการ โครงการจัดตั้งคณะเภสัชศาสตร์และร่างหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
- 2552 คณะทำงานจัดทำยุทธศาสตร์ต่างประเทศด้านเครื่องสำอาง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย
- 2551 - 2552 คณะทำงานเครือข่ายหลักของอุทยานวิทยาศาสตร์ภาคเหนือ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 2549 – 2554 หัวหน้าศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2548 – 2554 รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2548 คณะกรรมการบริหาร กลุ่ม Bionanosicence กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
- 2546 – 2554 ผู้อำนวยการศูนย์บ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2546 – 2548 ผู้ประสานงาน กลุ่มวิจัยและพัฒนาด้านเซลล์ต้นกำเนิด ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเทศไทย
- 2546 ปฏิบัติงานวิจัย ณ Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama ประเทศญี่ปุ่น
- 2546 – 2554 ที่ปรึกษาด้านการวิจัย ของสถาบันวิจัยศาสตร์ด้านความงามและสุขภาพ จำกัด (IBHS) จังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย
- 2545 – 2552 ผู้ประสานงานเครือข่าย ASEAN-Uninet มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2545 – 2549 ผู้อำนวยการหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2544 – 2551 ผู้ช่วยอธิการบดี มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2545 หัวหน้าศูนย์ทดสอบชีวสมมูลของยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย
- 2542 – 2548 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย

- 2542 ปฏิบัติงานวิจัย College of Pharmacy, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2541 เยี่ยมชมสถาบันวิจัยของบริษัท Unilever Home & Personal Care, Rolling Meadows, IL Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2539 เยี่ยมชมสถาบันวิจัยของบริษัท KANEBO จำกัด Kanagawa ประเทศญี่ปุ่น
- 2535- 2536 นักวิชาการอาหารและยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
- 2532-2534 เกษัชกร สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย
- 2531 ตัวแทนจำหน่ายยา บริษัท Hoechst ประเทศไทย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

รางวัลเชิดชูเกียรติและทุนการศึกษา

- 2546 ทุนอุดหนุนนักวิจัยแลกเปลี่ยนภายใต้โครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างไทย-ญี่ปุ่น (NRCT-JSPS)
- 2536-2540 นักเรียนทุนรัฐบาล (ประเทศไทย)ในระดับปริญญาโท - เอก
- 2539 ผู้ผ่านการคัดเลือกจากกรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ให้เข้าร่วมโครงการแนวทางพัฒนาประเทศ การแลกเปลี่ยนทางด้านเทคโนโลยี และ วัฒนธรรม ในประเทศญี่ปุ่น (IATSS)
- 2526-2531 นักเรียนทุนระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

ตัวอย่างผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

- 2554 ชื่อเรื่อง “Antioxidant activity and antiapoptotic effect of Asparagus racemosus root extracts in human lung epithelial H460 cells”.
- วิจัยโดย Kongkaneramt L, Witoonsaridsilp W, Peungvicha P, Ingkaninan K, Waranuch N, Sarisuta N.
- วารสาร *Experimental and Therapeutic Medicine* 2, 143-148.
- 2553 ชื่อเรื่อง “Evaluation of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on the biological functions of fibroblasts from wrinkles”.
- วิจัยโดย Viyoch J, Buranajaree S, Grandmottet F, Robin S, Binda D, Viennet C, Waranuch N, Humbert P.

- วารสาร Journal of Cosmetic Sciences 61,(4) 311-324.
- 2553 **ชื่อเรื่อง** “Formation of particles prepared using chitosan and their trimethyl chitosan derivatives for oral vaccine delivery: Effect of molecular weight and degree of quaternization”.
- วิจัยโดย** Boontha, S., Junginger, H.E., Waranuch, N., Polnok, A., Pitaksuteepong, T.
- วารสาร Songklanakarin Journal of Science and Technology 32,(4) 363-371.
- 2553 **ชื่อเรื่อง** “Effects of Trans-4-(Aminomethyl) Cyclohexanecarboxylic Acid/Potassium Azeloyl Diglycinate/Niacinamide topical emulsion in thai adults with melasma: A single-center, randomized, double-blind, controlled study”.
- วิจัยโดย** Viyoch J, Tengamnuay I, Phetdee K, Tuntijarukorn P, Jampachaisri K, Waranuch N.
- วารสาร Current Therapeutic Research 71,(6) 345-459.
- 2550 **ชื่อเรื่อง** “Targeted transfollicular delivery of artocarpin extract from Artocarpus incisus by means of microparticles”.
- วิจัยโดย** Pitaksuteepong T, Somsiri A, Waranuch N.
- วารสาร European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 67,(3) 639-645.
- 2550 **ชื่อเรื่อง** “Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration”
- วิจัยโดย** Boonyo W, Junginger HE, Waranuch N, Polnok A, Pitaksuteepong T.
- วารสาร Journal of Controlled Release 121: (3), 168-175.
- 2548 **ชื่อเรื่อง** “Growth Suppression of Hamster Flank Glands by Topical Application of an Extract from “Kwao Keur”, *Pueraria mirifica*”.
- วิจัยโดย** Waranuch N, Thongruang C.
- วารสาร Naresuan University Journal 13: (2) 27 – 33.
- 2544 **ชื่อเรื่อง** “Topical formulation for targeted delivery into hair follicles”
- วิจัยโดย** Waranuch, N., Ramachandran, C., Weiner, ND.
- วารสาร IFSCC Magazine 4: (3) 207-210
- 2542 **ชื่อเรื่อง** “AHAs (alpha hydroxy acids) and skin care”
- วิจัยโดย** Waranuch N.
- วารสาร Faculty of Pharmaceutical Sciences News Letters, Naresuan University 1: (3) 2-3.
- ชื่อเรื่อง** “Controlled topical delivery of hydrocortisone and manitol via select pathways”
- วิจัยโดย** Waranuch, N., Ramachandran, C., Weiner, ND.

วารสาร Journal of Liposome Research 9: (1) 139-153

ชื่อเรื่อง “The influence of metabolism on percutaneous absorption of cyclosporin-A”. วิจัยโดย
Waranuch, N., Ramachandran, C., Weiner, ND.

วารสาร Journal of Liposome Research 9: (1) 129-138.

2542 ชื่อเรื่อง “Controlled topical delivery of cyclosporin-A from nonionic liposomal formulations:
Mechanistic aspects”

วิจัยโดย Waranuch, N., Ramachandran, C., Weiner, ND.

วารสาร Journal of Liposome Research 8: (2) 225-238

2541 ชื่อเรื่อง “Effect of lipid composition on a topical delivery of cyclosporin-A from nonionic
liposomal formulations: An in vitro study with hairless mouse skin.”

วิจัยโดย Waranuch, N., Ramachandran, C., Weiner, ND.

วารสาร Journal of Liposome Research 7: (2-3) 261-271.

การนำเสนอผลงาน

2551 นำเสนอผลงานโดยการบรรยาย เรื่อง “In vitro human skin permeation of green tea loaded
chitosan microparticles”.

ในการประชุม 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical
technology วันที่ 7-10 เมษายน 2551 ณ เมืองบาร์เซโลนา ประเทศสเปน

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Development of green tea extract entrapped in chitosan
microparticles using water in silicone emulsion”.

2550 รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Preparing chitosan microparticles containing green tea extract using water
in silicone emulsion”.

ในการประชุม Annual Meeting of Korean Society of Pharmaceutical Sciences and Technology
(KSPST) ครั้งที่ 37 วันที่ 22 – 23 พฤศจิกายน 2550 ณ กรุงโซล ประเทศเกาหลี

2550 รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Trans-follicular Delivery of Bioactive Materials for Hair Growth
Promotion”

ในการประชุม Thai-German Symposium on Regenerative Medicine ครั้งที่ 1 วันที่ 8 – 10
พฤศจิกายน 2550 ณ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

2550 รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Clinical Evaluation of Cosmetic Products”.

ในการประชุม Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 33) ครั้งที่ 33 วันที่ 18 - 20 ตุลาคม 2550 ณ นครศรีธรรมราช ประเทศไทย

- 2550 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Effect of Capsaicin on Diclofenac Diethylammonium Absorption from Adhesive Patch into Mouse Skin”.

ในการประชุม World Congress of the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP (PSWC) ครั้งที่ 3 วันที่ 22-25 เมษายน 2550 ณ กรุงอัมสเตอร์ดัม ประเทศเนเธอร์แลนด์

- 2548 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Growth Suppression of Hamster Flank Glands by Topical Application of an Extract from “Kwao Keur”, *Pueraria mirifica*”.

ในการประชุม International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research ครั้งที่ 53 .วันที่ 21-25 สิงหาคม 2548 ณ กรุงฟลอเรนซ์ ประเทศอิตาลี

- 2546 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Effect of Capsaicin on Diclofenac Sodium Absorption into Mouse Skin”

ในการประชุม Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. ครั้งที่ 31 . วันที่ 12-19 มิถุนายน 2546 ณ ไฮโนลูลู รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 2545 รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Skin Absorption: A Consideration for the Development of Phytocosmetics”.

ในการประชุม The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage Short Course Training on Medicinal Plants. วันที่ 15 มกราคม 2545 ณ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

- 2544 รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Topical Formulations for Targeted Delivery into Hair Follicles”.

ในการประชุม Scientific Conference of the Asian Societies of Cosmetic Scientist ครั้งที่ 5 วันที่ 2 มีนาคม 2544 ณ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

- 2541 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Topical Delivery of Hair Growth Drugs into Hair Follicles”.

ในการประชุม American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition. วันที่ 16 พฤศจิกายน 2541 ณ เมืองซานฟรานซิสโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 2540 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Controlled Topical Delivery of Mannitol and Hydrocortisone Using Nonionic Liposomal Formulations”

ในการประชุม American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition. วันที่ 4 พฤศจิกายน 2540 ณ เมืองบอสตัน รัฐมาสซาชูเซต ประเทศสหรัฐอเมริกา

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Controlled Topical Drug Delivery Across Select Pathways”

ในการประชุม International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials ครั้งที่ 24 วันที่ 18 – 19 มิถุนายน 2540 ณ เมืองสตอกโฮล์ม ประเทศสวีเดน

นำเสนอผลงานโดยการบรรยาย เรื่อง “Controlled Topical Delivery of Cyclosporin-A”.

ในการประชุม Pharmeceutics Seminar, College of Pharmacy, The University of Michigan. วันที่ 19 มีนาคม 2540 ณ รัฐมิชิแกน ประเทศสหรัฐอเมริกา

2539 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Topical Delivery of Cyclosporin-A from Nonionic Liposomal Formulations: Mechanistic Aspects”.

ในการประชุม American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Tenth Anniversary Annual Meeting and Exposition. วันที่ 31 ตุลาคม 2539 ณ รัฐวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา

รับเชิญบรรยาย เรื่อง “Controlled Topical Delivery of Cyclosporin-A from Nonionic Liposomal Formulations” ณ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วันที่ 18 กรกฎาคม 2539 กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Controlled Topical Delivery of Cyclosporin-A from Nonionic Liposomal Formulations”

ในการประชุม International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials. วันที่ 8-9 กรกฎาคม 2539 ณ กรุงเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น

2538 นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Effect of Liposomal Lipid Ratio on the Rate and Extent of Uptake of Cyclosporin-A From Nonionic Liposomal Formulations: An In Vitro Study with Hairless Mouse Skin”

ในการประชุม American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Tenth Annual Meeting. วันที่ 8 พฤศจิกายน 2538 ณ หาดไมอามี รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา

สิทธิบัตร

2549 เรื่อง “แป้งทาลิวที่ผสมสารสกัดโปรตีนจากงูเห่า” (สิทธิบัตร# 25227)

2551 เรื่อง “กรรมวิธีการเตรียมอนุภาคโคโตะซานสำหรับบรรจุสารที่ละลายน้ำด้วยการใช้ระบบอิมัลชันชนิดน้ำในซิลิโคน” (คำขอเลขที่ 0801004680)

เกียรติประวัติและรับเป็นสมาชิก

2551 ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาข้อมูลทางวิชาการด้านเครื่องสำอาง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย

2540 รับเชิญเป็นสมาชิก Rho Chi, National Pharmacy Honor Society, สหรัฐอเมริกา

2539 ได้รับรางวัล The Nagai Foundation Tokyo Graduate Student Award

นักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกรกนก อิงคนินันท์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Kornkanok Ingkaninan

2. เพศหญิง สถานะทางการสมรส โสด

3. วัน เดือน ปีเกิด 19 มิถุนายน 2510 อายุ 43 ปี

4. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ 9

5. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-961860 โทรสาร 055-963731

6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) ห้อง 801 หอพัก มน.นิเวศน์ 6 มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง
จังหวัดพิษณุโลก 65000

7. E-mail Address k_ingkaninan@yahoo.com โทรศัพท์มือถือ 081-4817350

8. ประวัติการศึกษา

8.1 ปริญญาตรีสาขาเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่สำเร็จ 2533

คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.15

8.2 ปริญญาโทสาขาเภสัชเวท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่สำเร็จ 2537

คะแนนเฉลี่ยสะสม 4.00

หัวข้อวิทยานิพนธ์ Phytochemical Studies of *Bidens biternata* Merr. Sherff

8.3 ปริญญาเอกสาขา Leiden University, The Netherland

ปีที่สำเร็จ 2543 คะแนนเฉลี่ยสะสม -

หัวข้อวิทยานิพนธ์ Novel procedures for lead finding in plant extracts; Application of CPC
prefractionation and on-line HPLC-UV-MS-biochemical detection

9. ผลงานวิจัยย้อนหลังตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005 ถึงปัจจุบัน

9.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Nuengchamnong, N., de Jong, C.F., Bruyneel, B., Niessen W.M.A., **Ingkaninan, K.**, Irth I
(2005) HPLC on-line coupled to Mass spectrometry and bioactivity for screening the radical scavenger
compounds in *Butea superba* Roxb. *Phytochem. Anal.* 16: 422-428.

2. Nuengchamnong, N., **Ingkaninan, K.** (2005) Evaluation of antioxidant activity in Thai herbal
beverage and wine. *FDA Journal* 2:65-70.

3. Thanabhorn, S., Jaijoy, K., Thamaree, S., **Ingkaninan, K.** and Panthong, A. (2005) Acute and
subacute toxicity study of the ethanol extract from *Alternanthera philoxeroides* Griseb. *Mahidol
University J. Pharm. Sci.* 32:7-14.

4. Thanabhorn, S., Jaijoy, K., Thamaree, S., **Ingkaninan, K.** and Panthong, A. (2005) Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Cyperus rotundus* Linn. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 32:370-373.
5. Markmee, S., Ruchirawat, S., Prachyawarakorn, V., **Ingkaninan, K.**, Khorana, N. (2006) Isoquinoline Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2170-2172.
6. **Ingkaninan, K.**, Phengpa, P., Yuenyongsawad, S., Khorana, N. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* Tuber. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58:695-700.
7. **Ingkaninan, K.**, Changwijita, K., Suwanborirux, K. (2006) Vobasinyl-Iboga Bisindole Alkaloids, Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 847-852.
8. Thanabhorn, S., Jaijoy, K., Thamaree, S., **Ingkaninan, K.** and Panthong, A. (2006) Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *J. Ethnopharmacol.* 107:370-373.
9. Thanabhorn, S., Jaijoy, K., Thamaree, S., **Ingkaninan, K.** and Panthong, A. (2006) Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from the fruits of *Terminalia belerica*. *Mahidol University J Pharm Sci*. 33: 23-30.
10. Sriprang, S., Khorana, N. and **Ingkaninan, K.** (2006) Acetylcholinesterase Inhibitor from *Stephania suberosa* Forman. *NU Science Journal* 3: 1-11.
11. Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., **Ingkaninan, K.** and Chattipakorn, N. (2007) *Tabernaemontana divaricata* Extract Inhibits Neuronal Acetylcholinesterase Activity in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 110:61-68.
12. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., and **Ingkaninan, K.** (2007) An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal. Chim. Acta.* 584:1-6.
13. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., and **Ingkaninan, K.** (2007) Determination of pseudojubilogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem. Anal.* 18: 411-418.

14. Nuengchamnong, N., **Ingkaninan, K.**, Kaewruang, W., Wongareonwanakij, S., and Hongthongdaeng, B. (2007) Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15: 853-858.
15. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S., and **Ingkaninan, K.** (2007) Comparison of Various Extraction Methods of *Bacopa monnieri* Naresuan University Journal. 15:29-34.
16. Kamonwannasit, S., Putalun, W., Phrompittayarat, W. **Ingkaninan, K.**, Tanaka, H. (2007) Production of Pseudojubilogenin from callus cultures of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *IJPS*. 3: 53-59.
17. Langjae, R, Bussarawit, S, Yuenyongsawad, S, **Ingkaninan, K.**, Plubrukarn, A. (2007) Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp. *Steroids*. 72: 682-685.
18. Phrompittayarat, W., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., **Ingkaninan, K.** (2007) Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2: 26-32.
19. Boriwanwattanak P., **Ingkaninan K.**, Khorana N., Viyoch J. (2008) Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as controlled-release matrix. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30(3):205-218.
20. Nukoolkarn, V.S., Saen-oon, S., Rungrotmongkol, T., Hannongbua, S., **Ingkaninan, K.**, Suwanborirux K. (2008) Petrosamine, a potent anticholinesterase pyridoacridine alkaloid from a Thai marine sponge *Petrosia* n. sp. *Bioorg Med Chem*. 16(13):6560-6567.
21. Temkitthawon, P., Viyoch, J., Limpeanchob, N., Pongamornkul, W., Sirikul, C., Kumpila, A., Suwanborirux, K., **Ingkaninan K.** (2008) Screening for phosphodiesterase inhibitory activity of Thai medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119, (2): 214-217.
22. Phrompittayarat, W., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., **Ingkaninan, K.** (2008) Stability studies of saponins in *Bacopa monnieri* dried ethanolic extracts. *Planta Med.* 74:1756-1763.
23. Yoysungnoen P., Kantasa, P., **Ingkaninan, K.** (2008) Cardiovascular effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract in anesthetized rats. *TJPS*. 21: 2-7.
24. Sangnoi, Y., Sakulkeo, O., Yuenyongsawad, S., Kanjana-opas, A., **Ingkaninan, K.**, Plubrukarn, A., Suwanborirux, K. (2008) Acetylcholinesterase-inhibiting activity of pyrrole derivatives from a novel marine gliding bacterium, *Rapidithrix thailandica*. *Mar. Drugs* 578-586.

25. Tiyafoonchai, W., Srisopa, P., Viyoch, J., **Ingkaninan, K.** (2008) Solid lipid microparticles as a delivery carrier for turmeric crude extract containing curcuminoids. *Naresuan University Journal* 16: 43-45.
26. Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W., **Ingkaninan, K.** (2008) Neuroprotective Effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J. Ethnopharmacol.* 120:112-117.
27. Saraphanchotiwiththaya, A., **Ingkaninan, K.**, Sripalakit, P. (2008) Effect of *Bacopa monniera* Linn. extract on murine immune response in vitro. *Phytother Res.* 22:1330-1335.
28. Nuengchamnong, N., **Ingkaninan, K.** (2009) On-line Characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, (1): 297-302.
29. Khorana, N., Markmee, S., **Ingkaninan, K.**, Ruchirawat, S., Kitbunnadaj, R., Pullagurla, M.R.(2009) Evaluation of a new lead for acetylcholinesterase inhibition. *Med. Chem. Res.* 18:231–241.
30. Imsungnoen, N., Phrompittayarat, W., **Ingkaninan K.**, Tanaka, H., Putalun, W. (2009) Immunochromatographic assay for the detection of pseudojubilogenin glycosides. *Phytochem Anal.* 20:64-67.
31. Murebwayire, S., **Ingkaninan, K.**, Changwijit, K., Frédéricich, M., Duez, P. (2009) *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels (Menispermaceae), a potential source of acetylcholinesterase inhibitors. *J Pharm Pharmacol.* 61:103-107.
32. Nuengchamnong, N., Krittasilp, K., **Ingkaninan, K.** (2009) Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chem.* 117: 750-756.
33. Rabintossaporn, P., Saenthaweesuk, S., Thuppia, A., **Ingkaninan, K.**, Sireeratawong, S. (2009) The histological examination of livers in normal and streptozotocin-induced diabetic rats received *Annona squamosa* L. aqueous leaves extract. *Thammasat Medical Journal* 9: 39-44.
34. Rabintossaporn, P., Saenthaweesuk, S., Thuppia, A., **Ingkaninan, K.**, Sireeratawong, S. (2009) Antihyperglycemic and histological effects on the pancreas of the aqueous leaves extract of *Annona squamosa* L. in normal and diabetic rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31: 73-78.

35. Hansakul, P., Ngamkitidechakul, C., **Ingkaninan, K.**, and Panunto, W. (2009) Antiproliferative, apoptotic induction, and antiinvasive effects of *Leersia hexandra* (L.) Sw., *Panicum repens* Linn., and *Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf extracts on human cancer cells. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31: 79-84.
36. Thuppia, A., Rabintossaporn, P., Saenthaweesuk, S., **Ingkaninan, K.**, Sireeratawong, S. (2009) Hypoglycemic effect of the water extract from leaves of *Lagerstroemia speciosa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31: 133-137.
37. Saenthaweesuk, S., Thuppia, A., Rabintossaporn, P., **Ingkaninan, K.**, Sireeratawong, S. (2009) The study of hypoglycemic effects of the *Morus alba* L. leave extract and histology of the pancreatic islet cells in diabetic and normal rats. *Thammasat Medical Journal* 9: 33-40.
38. Nuengchamnong, N., **Ingkaninan, K.** (2010) On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. *Food Chem.* 118: 147-152.
39. Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S., **Ingkaninan, K.** (2010) Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J. Ethnopharmacol.* 127: 26-31.
40. Tep-Areenan, P., **Ingkaninan, K.**, Randall, M.D. (2010). Mechanisms of *Kaempferia parviflora* extract (KPE)-induced vasorelaxation in the rat aorta. *Asian Biomed.* 4: 103-111.

9.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น proceeding หนังสือ ฯลฯ)

อนุสิทธิบัตร

ชื่อเรื่อง	กรรมวิธีการเตรียมสารสกัดที่มีชาไปนินสูงจากพรมมิ
เลขที่อนุสิทธิบัตร	4018
คุ้มครองสิทธิตั้งแต่	7 กุมภาพันธ์ 2551- 28 มกราคม 2556
ผู้ประดิษฐ์	รศ. ดร. กรรณก อิงคินันท์ และ ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์

10. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ เกษษเวท/ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

11. รางวัลวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย)

เกสรเกียรติคุณ สาขาเกษตรกรรม การศึกษา พัฒนาและวิจัย โดยกลุ่มเกษตรภาคเหนือ ปี 2551

12. ท่านมีเวลาในการทำวิจัยประมาณสัปดาห์ละ 30 ชั่วโมง
13. การสนับสนุนจากสถาบันต้นสังกัด (ถ้ามี)

นักวิจัย

1. ชื่อ ดร. พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3102400100873

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ 7

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ต.ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิจิตร 65000

หมายเลขโทรศัพท์ 055 – 964-650 โทรสาร 055 – 964-770

E-mail: taepavap@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ. 2532	ตรี	วท.บ. (เกียรตินิยมอันดับ 2) (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศิลปากร	ไทย
พ.ศ. 2536	โท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	สรีรวิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
พ.ศ. 2541	โท	M.Sc.	Neuroscience	Univ. of British Columbia	แคนาดา
พ.ศ. 2546	เอก	Ph.D.	Neuroscience	Univ. of British Columbia	แคนาดา
พ.ศ. 2550	การศึกษา หลังปริญญาเอก	Post-Doctoral Fellow	Neuropsychology	Univ. of Prince Edward Island & Atlantic Veterinary Medicine College, Univ. of British Columbia	แคนาดา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

ประสาทเคมีวิทยา (neurochemistry), ประสาทชีววิทยาเกี่ยวกับการเสพติด (neurobiology of drug addiction), ประสาทพฤติกรรมศาสตร์ (behavioral neuroscience)

7. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. การตรวจสอบฤทธิ์ของพรมมิต่อพฤติกรรมการณ์เคลื่อนไหว การเรียนรู้และความจำ (ทุนบูรณาการสมุนไพรร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2548)
2. การศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อระดับสารสื่อประสาทกลูตาเมตในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรท (ทุนบูรณาการสมุนไพรร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2549)
3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำ (แหล่งทุน สกว ปี 2551)

7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. การตรวจสอบฤทธิ์ของ จิง พริกไทย และดีปลี ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (ทุนบูรณาการสมุนไพรร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2548)
2. การศึกษาพิษแบบเฉียบพลันและพิษแบบเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ (ทุนบูรณาการสมุนไพรร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2548)
3. การศึกษาผลของสารสกัดตรีภูกต้อระดับสารสื่อประสาทกลูตาเมตในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรท (ทุนบูรณาการสมุนไพรร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2549)
4. การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรจากรากพุดจิบต่อการทำงานของระบบประสาทระบบกล้ามเนื้อ ระบบหลอดเลือด และ ระบบไต (ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2549)
5. ผลของสารสกัดรากพุดจิบต่อการทำงานของอะซิติล โคลีนเอสเทอเรสและปฏิกิริยาอะปอโรออกซิเดชันในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้สูญเสียความจำด้วย amyloid beta-peptide 25-35 (ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2550)
6. การศึกษาพิษแบบเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพรรจากรากพุดจิบ (ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2551)
7. การศึกษาฤทธิ์ด้านอาการต่อมลูกหมากโตของสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆในหนูแรท (ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2552)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

1. Jeenapongsa R, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, Limsiriwong P, Klungsupya P (2005) Memory Improvement and Antioxidative Effects of Piper Nigrum. Poster presented at the 20th FAPA congress , Thailand. (ทุน วว. 2548)

2. Klungsupya P, Limsiriwong P, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, Jeenapongsa R (2005) Antioxidant Activity Study of Curcuma Longa L. Extract using memory-impaired rats. Poster presented at the 20th FAPA congress, Thailand. (พ.น. ๖๖. 2548)
3. Sopradit P, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N (2006) Investigations of Antiamnesic and Antinociceptive Effects of Black Pepper Extract. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006. (พ.น. ๖๗. 2548)
4. Taepavarapruk N, Sopradit P, **Taepavarapruk P** (2006) Nootropic Action of *Tabernaemontana divaricata* Root Extract in Amnesic Mice Induced by Scopolamine. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006. (พ.น. ๖๗. 2549)
5. **Taepavarapruk P**, Sewana S, Jeenapongsa R, Taepavarapruk N (2006) Investigation of Nootropic Effects of *Bacopa monnieri* Extract on Global Amnesic Rats. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006. (พ.น. ๖๗. 2548)
6. Klungsupya P, Limsiriwong P, Jeenapongsa R, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, (2006) Improvement of Brain Function by Curcuma Longa Extract in Memory-Impaired Rats. Poster presented at the 4th International Symposium on the Family Zingiberaceae, Singapore. (พ.น. ๖๖. 2548)
7. Sopradit P, **Taepavarapruk P**, Ingkaninan K, Taepavarapruk N (2007) Acute and subchronic effects of Trikatu on central nervous system functions of mice. Oral presentation, the 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand. (พ.น. ๖๗. 2548)
8. Preedapirom W, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N. (2007) Effect of Mitragynine on cerebellar Purkinje cell activity in anesthetized rats. Poster presented at the Annual Meeting of Thai Physiology Society, Ayudthaya, Thailand. (พ.น. คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2547)
9. Kembubpha S, Sopradit P, Ingkaninan K, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N (2007) Screening of anticonvulsive action of Brahmi and Trikatu crude extracts. Poster presented at the 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand. (พ.น. ๖๗. 2548)

10. Praisingha A, Keingsanteir S, Akeuranpan S, Khongsombat O, **Taepavarapruk P**, and Taepavarapruk N (2008) Effects of Trikatu Extract on Changes in Glutamate and Aspartate Efflux in the Rat's Hippocampus. Poster presented at the 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand. (พ.น. ๖๕. 2549)

ผลงานวิจัยที่ผ่านมา

1. **Taepavarapruk P**, Floresco SB, Phillips AG (2000) Hyperlocomotion and increased dopamine efflux in the rat nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum: role of ionotropic glutamate and dopamine D1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 151:242-251.
2. **Taepavarapruk, P.**, and Phillips, A.G. (2001) Role of the prefrontal cortex and the ventral tegmental area in mediating release of dopamine in the nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum. *Proceedings of the 9th International Conference on In Vivo Methods*, 223-224.
3. Howland JG, **Taepavarapruk P**, Phillips AG (2002) Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *J Neurosci* 22:1137-1145.
4. Phillips AG., **Taepavarapruk P**. (2002) Understanding the neurobiology of relapse: A key factor in the process of addiction. In L. Pulvirenti & M. Massotti (Eds). *Second Conference on the Neuroscience of Drug Addiction. Monograph Series of the Istituto Superior di Sanita, Rome, Italy.*
5. **Taepavarapruk P**, Phillips AG (2003) Neurochemical correlates of relapse to d-amphetamine self-administration by rats induced by stimulation of the ventral subiculum. *Psychopharmacology (Berl)* 168:99-108.
6. Howland JG, MacKenzie EM, Yim TT, **Taepavarapruk P**, Phillips AG (2004). Electrical Stimulation of the Hippocampus Disrupts Prepulse Inhibition in Rats: Frequency and Site Dependent Effects. *Behav Brain Res*. 2004 Jul 9;152(2):187-97.
7. Nakdook W, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N and Khongsombat O. (2007) A preliminary study of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid β peptide₃₅₋₂₅ induced cognitive deficits in mice. *Proceeding of the 3rd Naresuan University Research Conference*: 138-144.

8. Taepavarapruk N, **Taepavarapruk P**, Joshi J, Lai YY, Siegel J, Phillips AG, McErlane SA, and Soja, PJ (2008) State-Dependent Changes in Glutamate, Glycine, GABA, and Dopamine Levels in Cat Lumbar Spinal Cord. *J. Neurophysiol.* 100(2):598-608.
9. **Taepavarapruk P**, Howland JG, Ahn S, and Phillips AG (2008) Neural circuits engaged in ventral hippocampal modulation of dopamine function in medial prefrontal cortex and ventral striatum. *Brain Structure and Function*. Springer, Berlin. pp. 1863-2653.
10. Song C, **Taepavarapruk P**, Zhang Y. (2008) Acute and chronic IL-1 β administrations differentially modulate learning and memory, acetylcholine efflux and neurotrophin expressions in the hippocampus possible mechanism involved in neuroprotection and neurodegeneration. *Brain Beh Immun* 22: S41.
11. Preedapirom W, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N. Acute Inhibitory Action of Mitragynine, Extracted from Young Leaves of *Mitragyna speciosa* Korth., on Cerebellar Purkinje Cell Activity. *Naresuan University Journal* (in press).

Abstracts and Presentations

1. **Taepavarapruk P**, Blaha CD, and Phillips AG. (1998) Decrease in extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens induced by low frequency stimulation of the ventral subiculum/CA1 region of the rat hippocampus. Poster presented at the 28th Annual meeting of the Society for Neuroscience, Los Angeles, CA, Society for Neuroscience Abstract 823.2.
2. **Taepavarapruk P**, Di Ciano P, and Phillips AG. (1998) Differential effects of repeated escalating doses of d-amphetamine on in vivo measurement of dopamine in the dorsal and ventral striatum of the rat. Poster presented at the Advancing from the Ventral Striatum to Extended Amygdala: Implications for Neuropsychiatry and Drug Abuse, Charlottesville, VA, Meeting New York Acad Sci, P19.
3. **Taepavarapruk P** and Phillips A.G. (1999) The role of ionotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens dopamine efflux and motor activity evoked by high frequency stimulation of the ventral subiculum. Poster presented at the 29th Annual meeting of the Society for Neuroscience, Miami, FL, Society for Neuroscience Abstract 882.21.
4. **Taepavarapruk P** and Phillips A.G. (2000) Short- and long-term changes in nucleus accumbens dopamine efflux after repeated electrical stimulation of the ventral subiculum.

- Poster presented at the ^{30th} Annual meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, Society for Neuroscience Abstract 845.35.
5. Howland J, **Taepavarapruk P**, and Phillips AG. (2000). High frequency stimulation of the basolateral amygdala induces a long lasting increase in dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. Poster presented at the ^{30th} Annual meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, Society for Neuroscience Abstract 644.4.
 6. **Taepavarapruk P** and Phillips A.G. (2001) Role of the prefrontal cortex and the ventral tegmental area in mediating release of dopamine in the nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum. Poster presented at the ^{9th} International Conference on *In Vivo* Methods. University College Dublin, Dublin Ireland.
 7. **Taepavarapruk, P.**, and Phillips A.G. (2001) Reinstatement of *d*-amphetamine-seeking behavior during abstinence and extinction induced by high frequency stimulation of the ventral subiculum. Poster presented at the ^{31st} Annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, Society for Neuroscience Abstract 878.14.
 8. Howland J, **Taepavarapruk P**, and Phillips A.G. (2001). High frequency stimulation of the basolateral amygdala induces a long lasting increase in dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. Poster presented at the ^{31st} Annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, Society for Neuroscience Abstract 373.18
 9. **Taepavarapruk P**, Ahn S, Howland J, and Phillips A. (2002) Mechanism underlying dopamine efflux in the medial prefrontal cortex evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum. Poster presented at ^{12th} annual Canadian Society for Brain, Behaviour and Cognitive Science meeting, Vancouver, Canada.
 10. **Taepavarapruk P**, Ahn S, & Phillips A. (2002) Comparison of dopamine function in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex during long-term self-administration of *d*-amphetamine by rats. Poster presented at FENS Forum 2002.
 11. Howland J., Mckovic E., Yim T., **Taepavarapruk P.**, and Phillips A. (2003) Unilateral electrical stimulation of the hippocampus disrupts prepulse inhibition in Long-Evans rats: Frequency and state dependent effects. Poster presented at ^{33rd} Society for Neuroscience Meeting, New Orleans, Louisiana.
 12. **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, Joshi J, Lai YY, Siegel J, McErlane SA, and Soja PJ (2003). Stimulation of the nucleus reticularis gigantocellularis suppresses dorsal

- spinocerebellar tract neuron activity and releases amino acid neurotransmitters in Clarke's column of the upper lumbar spinal cord. Poster presented at ^{17th} Annual Meeting of Association of Professional Sleep Societies, Chicago, Abstract 0050.A, p A21.
13. Taepavarapruk N, **Taepavarapruk P**, Joshi J, Lai YY, Siegel J, McErlane SA, and Soja PJ (2003) State-dependent release of glycine and GABA in Clarke's column of the upper lumbar spinal cord. Poster presented at ^{17th} Annual Meeting of Association of Professional Sleep Societies, Chicago, Abstract 0027.A, p A11-A12.
 14. **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, McErlane SA, Phillips A.G., and Soja P.J. (2003) State dependent release of dopamine in Clarke's column of the upper lumbar spinal cord. Poster presented at ^{33rd} Society for Neuroscience Abstract 29: 499.19.
 15. Jeenapongsa R, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, Limsiriwong P, Klungsupya P (2005) Memory Improvement and Antioxidative Effects of *Piper Nigrum*. Poster presented at the ^{20th} FAPA congress, Thailand.
 16. Klungsupya P, Limsiriwong P, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, Jeenapongsa R (2005) Antioxidant Activity Study of *Curcuma Longa L.* Extract using memory-impaired rats. Poster presented at the ^{20th} FAPA congress, Thailand.
 17. Taepavarapruk N., Sopradit P., and **Taepavarapruk P**. (2006) Effects of *Tabernaemontana Divaricata* Root Extract on Scopolamine-Induced Nociception in Mice. Poster presented at the ^{35th} Annual Meeting of Thai Physiology Society, ChiangMai, Thailand.
 18. **Taepavarapruk P.**, Sewana S., Jeenapongsa R and Taepavarapruk N. (2006) Nootropic Effects of *Bacopa Monnieri* Extract on Global Amnesic Rats. Poster presented at the Annual Meeting of Thai Physiology Society, ChiangMai, Thailand.
 19. Sopradit P., **Taepavarapruk P.**, and Taepavarapruk N. (2006) Effects of *Piper Nigrum* Extract on Scopolamine-Induced Amnesia and Thermal-Induced Nociception in Mice. Poster presented at the Annual Meeting of Thai Physiology Society, ChiangMai, Thailand.
 20. Klungsupya P, Limsiriwong P, Jeenapongsa R, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N, (2006) Improvement of Brain Function by *Curcuma Longa* Extract in Memory-Impaired Rats. Poster presented at the ^{4th} International Symposium on the Family Zingiberaceae, Singapore.
 21. **Taepavarapruk P**, Kou W, Song C. (2007) Effects Of EPA on IL1 α -induced Memory Impairment and ACh Efflux in the Rat Hippocampus. Poster presented at the ^{3rd} CINP Asia

- Pacific Regional Meeting; Neuro-Psychopharmacology: Challenging for Better Research & Health, Bangkok, Thailand.
22. Kembubpha S, Sopradit P, Ingkaninan K, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N (2007) Screening of anticonvulsive action of Brahmi and Trikatu crude extracts. Poster presentation, the 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand.
 23. Preedapirom W, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N. (2007) Effect of Mitragynine on cerebellar Purkinje cell activity in anesthetized rats. Poster presentation, the 36th Annual Meeting of Thai Physiology Society, Ayudthaya, Thailand.
 24. Sopradit P, **Taepavarapruk P**, Ingkaninan K, Taepavarapruk N (2007) Acute and subchronic effects of Trikatu on central nervous system functions of mice. Oral presentation, the 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand.
 25. Preedapirom W, Nakdook W, Phruttipat S, Ingkaninan K, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N (2008a) The Investigation of Nootropic Effects of Some Thai Medicinal Plants Using Experimental Models of Amnesia. The 37th Physiological Society of Thailand's Annual Conference, 37:63.
 26. Preedapirom W, Sombuthaweekul R, Nakdook W, Ingkaninan K, Taepavarapruk N, **Taepavarapruk P** (2008b) Investigation of Cognitive Restoring Property of Some Thai Herbs Using Experimental Models of Amnesia. The 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, 3:24.
 27. Praisingha A, Keingsanteir S, Akeuranpan S, Khongsombat O, **Taepavarapruk P**, and Taepavarapruk N (2008) Effects of Trikatu Extract on Changes in Glutamate and Aspartate Efflux in the Rat's Hippocampus. Poster presented at the 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Phitsanulok, Thailand.
 28. Sombuthaweekul R, Preedapirom W, Nakdook W, Lerdtragool S, **Taepavarapruk P**, and Taepavarapruk N (2009) Screening of the nootropic effect of green tea byproduct in old rats. The 38th Physiological Society of Thailand's Annual Conference, O-06: 56.
 29. Nakdook W, **Taepavarapruk P**, Taepavarapruk N and Khongsombat O. (2009) Inhibitory effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on oxidative stress induced by amyloid β -

peptide25-35 in mice. The 38th Physiological Society of Thailand's Annual Conference, P-06: 74.

30. Preedapirom W, Sombuthaweekul R, Lerdtragool S, Taepavarapruk N, **Taepavarapruk P** (2009) Neuroprotective effects of green tea by-product in amyloid beta peptide-induced amnesic rats. . The 38th Physiological Society of Thailand's Annual Conference, P-16: 84.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัย คล่องแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1. การศึกษาพิษแบบเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพรจากรากพุทธรักษา (แหล่งทุน ทุน
งบประมาณแผ่นดิน ปี 2551 งานวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 70)
2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอาการต่อมลูกหมากโตของสารสกัดหยาบว่านมหาเมฆในหนูแรท (แหล่งทุน
ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2552 งานวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 30)

นักวิจัย

1.ชื่อ (ภาษาไทย) น.ส. นิตรา เนื่องจามงค์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Nitra Nuengchamngong

2.เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2097 00158 56 2

3.ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการพิเศษ

4.หน่วยงานที่สังกัด งานวิเคราะห์อาหารเคมี กลุ่มคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000 โทรศัพท์/โทรสาร 055 247580-2 ต่อ

168 nitra_nuengchamngong@yahoo.com, nitra.n@dmsc.mail.go.th

5.ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2527	ตรี	วท.บ.	เคมี	-	ม.รามคำแหง	ไทย
2541	โท	วท.ม.	เคมี	-	ม.เชียงใหม่	ไทย
2547	เอก	วท.ด.	เภสัชศาสตร์	-	ม.นเรศวร	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

เคมีวิเคราะห์ การหาสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการเชื่อมต่อ

(hyphenated techniques)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัย ในแต่ละเรื่อง

7.1 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1.1 ปฏิบัติงานวิจัยด้านการวิเคราะห์โดยนำเทคนิคต่างๆมาเชื่อมต่อกัน ณ Faculty of Science Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy ,Vrije University of Amsterdam the Netherlands เป็นเวลา 1 ปี พค.2546- พค.2547

7.1.2 โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรไทยและไวน์ไทยที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ

งบประมาณปี2549 (หัวหน้าโครงการ)

7.1.3 Characterisation of antioxidative activities of three herbal water extracts using on-line liquid chromatographic- mass spectrometric techniques and DPPH based assayงบประมาณปี2550 จำนวน 480,000 บาท จาก สกว. (หัวหน้าโครงการ)

7.1.4.การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อคุณภาพของสมุนไพรหม่อน และการพัฒนาสารสกัดพร้อมใช้จากสมุนไพรหม่อน (ผู้ร่วมวิจัย หาปริมาณสารDNJ โดยวิธี LC-MS)

7.1.5. การศึกษาฤทธิ์ต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อมบางชนิดของสมุนไพรไทย(ผู้ร่วมวิจัย)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์และสถานภาพในการทำวิจัย

1. **Nuengchamnong, N.,** Tepvitukij, P., Dumrongsawatwit,S., Bunpattanasak, S. and Jittawikul, T.(1995). Quality of Pasteurized and UHT Milk in the Lower Northern Region. *Food*, 25(4), 261-268.

2. **Nuengchamnong, N.,** Tepvitukij, P., Bunpattanasak, S., Wiriyaprasit, R., Kongsakul, N. and Jittawikul, T.(1995). The Quality of Water from Water Resources in Phitsanulok. *Buddhachinaraj Medical Journal*, 12(3), 209-214.

3. **Nuengchamnong, N.,** Tepvitukij, P., Bunpattanasak, S., Wiriyaprasit, R., Kongsakul, N. and Jittawikul, T. (1996). Quality of Bottled Drinking Water in the Lower Northern Region. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 38(3), 203-208.

4. สมศรี ดำรงสวัสดิ์วิทย์ , นิทรา เนื่องจำนงค์, ทิพวัลย์ จิตตะวิกุล (2539) สืบในขนมเล็กวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 38(1) : 81-86

5. **Nuengchamnong, N.,** Tepvitukij, P., Bunpattanasak, S., Tongta, W., Wiriyaprasit,R., and Jittawikul, T. (1999). The Quality of Bottled Drinking Water in the Lower Northern Thailand: Fiscal Year 1999. *Phitsanulok Public Health Journal*, 1(2), 21-26.

6.**Nuengchamnong, N.,** Dumrongsawatwit, S., and Tongta, W. (2000). Pesticide Residue in Hygienic Vegetables Sold in Phitsanulok Provinces. *Phitsanulok Public Health Journal*, 1(3), 34-38.

7. **Nuengchamnong, N.** and Jittawikul, T.(2000). Iodine Content in Iodated Salt, *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 42(3), 256-261.

8. **Nuengchamnong, N.,** Wiriyaprasit, R., and Jittawikul, T.(2000). Determination of Nitrate in Drinking Water by FIA. *Bulletin of the Department of Medical sciences*, 43(4), 364-371.

9. **Nuengchamnong, N.** and Jittawikul, T.(2001). Pesticide Residue in Dry Salted Fish in Phitsanulok. *Phitsanulok Public Health Journal*, 2(2), 22-25.

10. สมศรี ดำรงสวัสดิ์วิทย์, วาสิทธิ์ ทองทา และ นิทรา เนื่องจำนงค์ (2544) สารประกอบฟอสเฟต และสารคาร์บาเมตในผักสดและผลไม้ที่จำหน่ายในเขต เทศบาลนครพิษณุโลก /วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 43(4) ,387-394
11. **Nuengchamnong, N.**, Hermans, A. C. J. & Ingkaninan, K. (2004). Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal* 12(2), 25-37.
12. นิทรา เนื่องจำนงค์ และ กรรณก อิงคินันท์ (2548) การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน เครื่องดื่มสมุนไพรและไวน์ไทย วารสารอาหารและยา 12(2),65-70
13. นิทรา เนื่องจำนงค์ (2548) สารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภคน้ำตาล วารสารสื่อ โลกเคมีและเทคโนโลยี สถาบันวิจัยเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ฉบับประจำเดือน กรกฎาคม-สิงหาคม 2548 หน้า 8-12
14. นิทรา เนื่องจำนงค์ (2549) สารเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาเขียวพร้อมบริโภคน้ำตาล วารสารวิชาการสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข 15 (2),233-241.
15. **Nuengchamnong N**, de Jong CF, Bruyneel B, Niessen WMA, Irth H, Ingkaninan K. (2005) HPLC coupled on-line to ESI-MS and a DPPH-based assay for the rapid identification of anti-oxidants in *Butea superba*. *Phytochemical analysis* 16,422-428
16. **Nuengchamnong N**, Ingkaninan K, Kaewruang W, Wongareonwanakij S, Hongthongdaeng B. (2007). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 853-858.
17. **Nuengchamnong N**, Ingkaninan K. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT Food science and technology* 42(2009)297-302.
18. **Nuengchamnong N**, Ingkaninan K. On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. *Food Chemistry*. (in press).
19. นิทรา เนื่องจำนงค์, นงคราญ เรืองประพันธ์, สุภาภรณ์ คณิตวิทยา, สุดชญา ศรประสิทธิ์, ประภา พรหมพรหมศิริกุล, ภาวดี น้อยอาษา, บุญบง สุขเร. การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นในเครื่องดื่มที่ทำจากผลไม้และสมุนไพรไทย วารสารวิชาการสาธารณสุข ปีที่16 ฉบับที่5 กันยายน-ตุลาคม 2550 หน้า 778-786

20. นิทราเนื่องจํานงค์ นิภา สุวรรณกิจ วฐุ พรหมพิทยารัตน์ (2551) การตรวจวิเคราะห์การปนปลอมยาแผนปัจจุบันในยาสมุนไพร และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อการวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน ปีที่4ฉบับที่2 หน้า 93-103 กค.-ธค.2551

21. **Nuengchamnong N**, Krittasilp K, Ingkaninan K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chemistry* (in press)